

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIODEGRADACE ORGANICKÝCH LÁTEK APLIKACÍ TERMOFILNÍ
KULTURY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA PIECHOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIODEGRADACE ORGANICKÝCH LÁTEK APLIKACÍ TERMOFILNÍ KULTURY

APPLICATION OF THERMOPHILIC CULTURE FOR ORGANIC COMPOUNDS
BIODEGRADATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JANA PIECHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

FCH-DIP0228/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Piechová Jana Bc.

Studijní program

Chemie a technologie potravin (N2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)

Vedoucí diplomové práce

Ing. Libor Babák, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce

Název diplomové práce:

Biodegradace organických látek aplikací termofilní kultury

Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) provedení několika kultivací termofilních bakterií
- 3) vyhodnocení vybraných bioinženýrských parametrů
- 4) diskuze nad výsledky

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Piechová
student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem práce je studium biodegradability modifikovaných polyuretanových materiálů (pěn a folií) v glukosovém mediu a biodegradability syrovátky pomocí směsné aerobní termofilní bakteriální kultury rodů *Bacillus* a *Thermus*. Kultivace probíhaly ve fermentoru a v Erlenmayerových baňkách na temperované třepače.

Nejvýraznější degradace bylo dosaženo při odbourávání polyuretanů ve fermentoru. Docházelo zde k nejvýraznějšímu nárůstu biomasy i poklesu CHSK. Hlavní vliv na degradaci měl abiotický rozpad materiálu a až následně se mohla projevit utilizace štěpných produktů mikrobiálními kulturami. Z dosažených výsledků se jako nejvhodnější modifikační činidlo jeví 10 % karboxymethyl celulóza. Srovnáním polyuretanových pěn a folií jsou lépe odbouratelné polyuretany ve formě pěn.

Odbouráváním syrovátky ve fermentoru, která byla zbavena bílkovin, bylo dosaženo 50% poklesu CHSK a laktosy v prvních 20 hodinách.

Optimální pH pro biodegradaci syrovátky pro kultivace směsnou termofilní bakteriální kulturu se jeví hodnota 6,5.

Klíčová slova

Biodegradace, termofilní bakterie, syrovátka, modifikované polyuretany.

ABSTRACT

The aim of this work is focused on biodegradability study of modified polyurethane materials (foams and foils) in glucose medium and biodegradation of whey. The biodegradability was tested with using mixed thermophilic aerobic bacterial culture of the *Bacillus* and *Thermus* genera. The cultivations were practised in the fermentor and in Erlenmayer flasks in a heated shaker.

Maximal reduction of COD and culture growth has been achieved by biodegradation of polyurethane in the fermentor.

Main effect of degradation was abiotic destruction of PUR materials and consequent utilization of degradation products by bacterial culture. These tests indicated that the best modification agent for biodegradation was 10% carboxymethyl cellulose. The polyurethane foam was more decomposed then the polyurethane foil.

Biodegradation of whey without proteins in the fermentor was detected decrease of CHSK and lactose concentration about 50 % in 20th hour. Optimal conditions for whey biodegradation with the thermophilic bacterial culture were pH 6,5 and temperature 60 °C.

Keywords

Biodegradation, termophilic bacteria, whey, modified polyurethanes.

PIECHOVÁ, J. *Biodegradace organických látek aplikací termofilní kultury*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Za cenné rady a všestrannou pomoc patří mé poděkování vedoucímu diplomové práce ing. Liboru Babákovi, Ph.D., doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc a ing. Stanislavu Obručovi.

OBSAH

OBSAH	5
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Syrovátka	9
2.1.1. Bílkoviny	9
2.1.1.1. Kasein	10
2.1.1.2. Sérové bílkoviny	10
2.1.1.3. Význam syrovátkových bílkovin a jednotlivých aminokyselin	11
2.1.2. Dusíkaté látky nebílkovinné povahy	11
2.1.3. Mléčný cukr	11
2.1.3.1. Fyzikální vlastnosti	12
2.1.3.2. Chemické vlastnosti	12
2.1.3.3. Výroba laktosy	13
2.1.3.4. Využití laktosy	13
2.1.3.5. Význam laktosy ve výživě člověka	13
2.1.4. Tuk	14
2.1.5. Kyseliny	14
2.1.6. Minerální látky a stopové prvky	14
2.1.7. Vitaminy	15
2.1.8. Produkty ze syrovátky určené k dalšímu využití	15
2.1.9. Aplikace syrovátky a syrovátkových produktů	16
2.2. Polyuretany	18
2.2.1. Vlastnosti	19
2.2.2. Využití	19
2.2.3. Biodegradace polyuretanů	20
2.2.3.1. Proces a podmínky biodegradace	20
2.2.3.2. Vliv biodegradace na vlastnosti polymerů	21
2.3. Termofilní mikroorganismy	22
2.3.1. Adaptace na vysoké teploty	22
2.3.2. Výskyt termofilních mikroorganismů	22
2.3.3. Termofilní bakterie	23
2.3.3.1. Rod Bacillus	23
2.3.3.2. Rod Thermus	24
2.3.4. Využití termofilních bakterií k čištění odpadních vod	24
2.3.5. Význam v potravinářství	25
2.4. Analytické metody	25
2.4.1. VIS Spektrofotometrie	25
2.4.2. Turbidimetrie	26
2.4.3. Chromatografie	26
2.4.3.1. Chromatografie na tenké vrstvě	27
2.4.4. Princip metody Somogyi – Nelsona	28
2.4.5. Princip stanovení CHSK	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1. Použité chemikálie, materiál a přístroje	29
3.1.1. Chemikálie	29
3.1.1.1. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	29
3.1.1.2. Chemikálie pro stanovení CHSK	29
3.1.1.3. Chemikálie pro stanovení redukujících cukrů	30

3.1.1.4.	Chemikálie pro TLC chromatografii	30
3.1.2.	Přístroje	30
3.1.2.1.	Fermentor	31
3.1.3.	Materiál	32
3.1.3.1.	Použité kmeny bakterií a příprava kultivace	32
3.1.3.2.	Testované PUR pěny	32
3.1.3.2.1.	Příprava PUR pěny a folie pro fermentor	32
3.1.3.2.2.	Příprava PUR pěny a folie pro kultivaci na třepačce	32
3.1.3.3.	Testovaná syrovátka	33
3.1.3.3.1.	Příprava syrovátkového kultivačního media	33
3.2.	Kultivace	33
3.2.1.	Kultivace na třepačce - syrovátka	33
3.2.2.	Kultivace ve fermentoru – syrovátka	33
3.2.3.	Kultivace na třepačce – PUR pěny a folie	33
3.2.4.	Kultivace ve fermentoru – PUR pěn/ folie	34
3.3.	Analytické metody	34
3.3.1.	Analýza sedimentu	34
3.3.1.1.	Gravimetrické stanovení biomasy	34
3.3.1.2.	Stanovení biomasy turbidimetricky	34
3.3.2.	Analýza supernatanu	35
3.3.2.1.	Stanovení CHSK (chemické spotřeby kyslíku)	35
3.3.2.2.	Stanovení redukujících cukru metodou Somogyi – Nelsona	35
3.3.2.3.	Kvalitativní analýza sacharidů v syrovátce	35
3.3.3.	Mikroskopie PUR pěn a folií	35
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	36
4.1.	Kalibrace	36
4.1.1.	Kalibrace turbidimetrického stanovení biomasy	36
4.1.2.	Kalibrace CHSK	37
4.1.3.	Kalibrace redukujících cukrů	37
4.1.1.1.	Laktosa	37
4.1.1.2.	Glukosa	38
4.2.	Výsledky biodegradace PUR pěn a folií	38
4.2.1.	Kultivace na třepačce	38
4.2.1.1.	Turbidimetrické stanovení biomasy	38
4.2.1.2.	Stanovení CHSK	40
4.2.1.3.	Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona	41
4.2.1.4.	Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií	42
4.2.1.5.	Mikroskopické stanovení	43
4.2.2.	Kultivace ve fermentoru	44
4.2.2.1.	Stanovení biomasy	45
4.2.2.2.	Stanovení CHSK	46
4.2.2.3.	Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona	47
4.2.2.4.	Data zpracovaná programem COMMAN	48
4.2.2.4.1.	Saturace kyslíku	48
4.2.2.4.2.	Spotřeby roztoků upravující pH	49
4.2.2.5.	Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií	50
4.2.2.6.	Mikroskopické stanovení	50
4.2.	Výsledky degradace syrovátky	52
4.2.3.	Kultivace na třepačce	52
4.2.3.1.	Stanovení biomasy	52

4.2.3.2.	Stanovení CHSK.....	52
4.2.3.3.	Vývoj pH během kultivace.....	53
4.2.4.	Kultivace ve fermentoru	54
4.2.4.1.	Stanovení biomasy.....	54
4.2.4.2.	Stanovení CHSK.....	54
4.2.4.3.	Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona	55
4.2.4.4.	Data zpracovaná programem COMMAN	55
4.2.4.4.1.	Saturace kyslíku.....	56
4.2.4.4.2.	Spotřeby roztoků upravující pH.....	56
4.2.4.5.	Kvalitativní stanovení cukrů metodou TLC chromatografie	57
5.	ZÁVĚR	58
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	59
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	62
	PŘÍLOHY	63
	Tabulky Kalibrace	63
	Kultivace termofilní kultury v přítomnosti PUR na třepačce	64
	Kultivace termofilní kultury v přítomnosti PUR ve fermentoru.....	66
	Kultivace syrovátky na třepačce	69
	Kultivace syrovátky ve fermentoru	71

1. ÚVOD

Dříve byla syrovátka považována za bezcenný odpad mlékárenského průmyslu, jediné využití měla jako součást krmiv. Jelikož celková produkce sýra a tím i produkce syrovátky trvale stoupá, snaha o optimalizaci odpadového hospodářství mlékárenského provozu vedla k rozvoji nových technologií. Cílem je využití cenné suroviny a snížení zatížení životního prostředí [1-4].

Oblasti využití přebytečné syrovátky zahrnují výrobu různých potravinových doplňků, kvasničné biomasy, etanolu, také se prosazuje jako zdroj biologicky aktivních látek v farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Poptávka po výrobcích ze syrovátky v posledních letech neustále roste [1,4].

Jednou z možností zpracování syrovátky je biologická likvidace pomocí vhodných mikroorganismů. Jako nejvýhodnější se jeví použití směsné termofilní kultury.

Nevýhodou biodegradačních procesů jsou pak překážky v podobě kultivačních podmínek, které je nutno zabezpečit, resp. udržovat. Jedná se především o vyšší náklady na energetickou spotřebu při zajišťování dostatečné kultivační teploty, a nutnost předchozí úpravy materiálu.

V posledních desetiletích se značné úsilí polymerních chemiků soustředilo na studium možnosti přípravy snadno degradovatelných polymerů. Ty by do jisté míry mohly napomoci řešení problémů související s neustále narůstajícím objemem polymerních odpadů [26]. Tato práce byla zaměřena na odbourávání polyuretanů pomocí mikrobiální kultury, tzv. biodegradaci. Biodegradace polymerních materiálů je přirozený a ekologicky šetrný způsob likvidace odpadu, při kterém nevznikají prakticky žádné nežádoucí vedlejší produkty.

Problematická je však biodegradovatelnost syntetických polymerů. Často se jedná o materiály vůči biodegradaci rezistentní a je tedy nutné určitým způsobem je upravit. Možnou strategií je modifikace přírodním polymerem (deriváty celulózy, modifikované škroby,...), které jsou relativně lépe biodegradovatelné a tuto vlastnost pak předají i samotnému kopolymeru. [32].

Z technologického hlediska jde při zpracování odpadu především o odstranění či maximální snížení obsahu organických látek (vyjádřených jako CHSK nebo BSK).

Cílem této práce je studium degradačních schopností směsné kultury termofilních mikroorganismů při likvidaci syrovátkového odpadu a polyuretanových materiálů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Syrovátka

Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů nebo tvarohu. Chemické složení syrovátky závisí na složení původního mléka, charakteru použitého srážení, na stupni zahřátí mléka při pasteraci, na případném zředění syrovátky vodou a rovněž na stupni fermentace laktosy. Veškeré průměrné hodnoty týkající se složení, které jsou v literárních zdrojích uváděné, mohou sloužit jen jako orientační [2, 4, 5]

Při výrobě sýrů, kde dochází ke srážení bílkovin enzymovým syřidlem (při pH 5 – 6), vzniká sladká syrovátka. Při výrobě tvarohu, kdy dochází ke srážení okyselením (pH nižší než 5,1) vzniká syrovátka kyselá.

Tab. 1: Složení sladké a kyselé syrovátky [4, 6]

Složka (%)	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Sušina	5,0 - 7,0	5,0 - 7,0
Laktosa	4,13 - 5,0	3,63 - 4,5
Kyselina mléčná	stopy	až 0,8
Tuk	0,05 - 0,3	0,05 - 0,2
Čistá bílkovina	0,55 - 1	0,55 - 1
Nebílkovinný dusík	0,18	0,18 – 0,2
Popeloviny	0,46 - 0,6	0,67 – 0,8
pH	6,5 - 6,6	4,9 – 5,0

2.1.1. Bílkoviny

Nejcennější složkou syrovátky jsou patrně syrovátkové bílkoviny. Asi 80 % všech bílkovin v mléce tvoří kasein, který je přítomen ve formě koloidní disperze a sráží se pomocí kyselin, změnou stability micel v závislosti na pH (izoelektrický bod při pH 4,7–4,8), či pomocí syřidla (změna stability po hydrolýze). Dále jsou v mléce ve formě koloidního roztoku přítomny sérové (syrovátkové) bílkoviny (globulární bílkoviny) [4].

Kaseiny se snadno z mléka sráží, zatímco syrovátkové bílkoviny zůstávají obvykle rozpuštěné. Jejich obsah v syrovátce závisí na tepelném ošetření mléka před srážením a na dalších podmínkách výrobního procesu. Tepelnou denaturací části syrovátkových bílkovin se získá sraženina, na které je založena produkce syrovátkových sýrů. Ty sýry jsou často vyráběny ze směsi mléka a syrovátky [4, 6, 7]

Vzhledem k rozdílnému principu srážení existují rozdíly ve složení sladké a kyselé syrovátky. V syrovátce se na celkovém obsahu bílkovin podílí kasein (5,5 – 10,0 %) a sérové bílkoviny (90,0 - 94,5 %) [4].

Do syrovátky z výroby sýrů (sladké syrovátky) přechází rozpustný kaseinomakropeptid odštěpený syřidlem. Kyselá syrovátka (z výroby tvarohu) zase obsahuje více popelovin, především vápníku. Při kyselém srážení vytváří kasein síťovitou strukturu schopnou uzavírat do dutinek bakterie, tukové kuličky nebo tepelně denaturované sérové bílkoviny (kyselá syrovátka pak může být na tyto složky chudší) [4].

Bílkoviny lze třídit různými způsoby podle jejich chemických nebo fyzikálních vlastností a jejich biologických funkcí. Třídění bílkovin na kasein, albuminy a globuliny je postačující [7].

2.1.1.1. Kasein

Kasein obsahuje relativně vysoký podíl prolinu a hydrofobních aminokyselin a jeho struktura není stabilizována disulfidovými můstky. Díky tomu nemá zřejmě pevně danou sekundární a terciární strukturu. Mléko je v podstatě suspenzí micel kaseinu – hydrofilní část kaseinu je na vnějším povrchu těchto micel, zatímco hydrofobní části jsou orientovány dovnitř. Micely jsou navíc ještě stabilizovány vápníkem.

Kromě potravinářských účelů se kasein používá rovněž k výrobě různých lepidel, ochranných povrchů a plastů (knoflíky). Izoelektrický bod kaseinu je 4,6. Čistý kasein je nerozpustný ve vodě a slabých neutrálních pufrch, je však rozpustný ve slabých alkáliích a v roztoku některých solí jako jsou například šťavelan a octan sodný [8].

2.1.1.2. Sérové bílkoviny

Sérové bílkoviny jsou zpravidla tříděny na albuminy a globuliny. Mezi albuminy se řadí alfa-laktalbumin, beta-laktoglobulin a sérový albumin. Mléčný albumin je podobný (ale není totožný) s vaječným a krevním albuminem, obsahuje tytéž aminokyseliny, ale neobsahuje fosfor [4].

Alfa-laktalbumin patří mezi ve vodě rozpustné bílkoviny. Odpovídá za asi 25 % celkového obsahu syrovátkových bílkovin. V mléčné žláze se alfa-laktalbumin chová jako koenzym v biosyntéze laktosy. V některých zemích je používán komerčně v kojenecké stravě. Ta je díky obsahu alfa-laktalbuminu více podobna mateřskému mléku. Navíc alfa-laktalbumin může zlepšit odolnost a zmenšit riziko rozvoje některých rakovin [10, 11]. Je také dobrým zdrojem rozvětvených aminokyselin, což je vhodné pro výživu sportovců [9].

Beta-laktoglobulin tvoří 50 až 60 % celkové syrovátkové bílkoviny. Beta-laktoglobulin váže retinol (provitamin) a je bohatým zdrojem základní aminokyseliny cysteinu, který je důležitý pro syntézu glutathionu v játrech (chrání organismus před oxidačním stresem) [9].

Globuliny (imunoglobuliny) jsou různorodá skupina protilátek pocházejících z krevního séra dojnic a pro svůj ochranný charakter se označuje jako imunoglobuliny (IgG1, IgG2, IgA a IgM).[4]. Imunoglobuliny poskytují pasivní imunitu pro děti a také dokážou stimulovat imunitní funkce dospělých [10, 11].

Součástí sérových bílkovin je také proteázo-peptonová frakce, laktoferin a transferin. Kromě toho jsou v syrovátce obsaženy i bílkoviny membrán tukových kuliček [9].

Laktoferin je železo-vázající syrovátková bílkovina, která má rozmanité biologické funkce. Ty zahrnují absorpci a dopravu železa, antibakteriální, antivirové a antioxidační účinky, podporu imunity a stimulaci růstu prospěšné střevní mikroflóry [10, 11]. Laktoferin se v některých zemích používá v kojenecké stravě k prevenci průjemových onemocnění dětí [9].

Laktoperoxidasa je enzym přirozeně obsažený v mléce se značnými antimikrobiální účinky. Lze jej potenciálně využít jako přísadu do zubních past a ústních vod a tím ochránit chrup před tvorbou zubního kazu [10, 11].

2.1.1.3. Význam syrovátkových bílkovin a jednotlivých aminokyselin

Nutriční význam syrovátkových bílkovin spočívá v jejich snadné stravitelnosti, v příznivém složení aminokyselin, v přítomnosti některých bílkovin a jejich frakcí se speciálními účinky [19].

Syrovátkové bílkoviny obsahují všechny esenciální aminokyseliny ve vyváženém poměru z hlediska potřeb organismu. V porovnání s jinými zdroji bílkovin obsahují relativně více aminokyselin s rozvětveným řetězcem (valin, isoleucin a leucin), které údajně zpomalují nástup projevů únavy. Také obsahují často nedostatkové sirné aminokyseliny (methionin a cystin). Jsou rovněž zdrojem glutaminu, který má vliv na podporu imunity a růst a obnovu svalové tkáně, argininu, který podporuje rychlost zotavení po námaze a tryptofanu – prekursoru serotoninu [20].

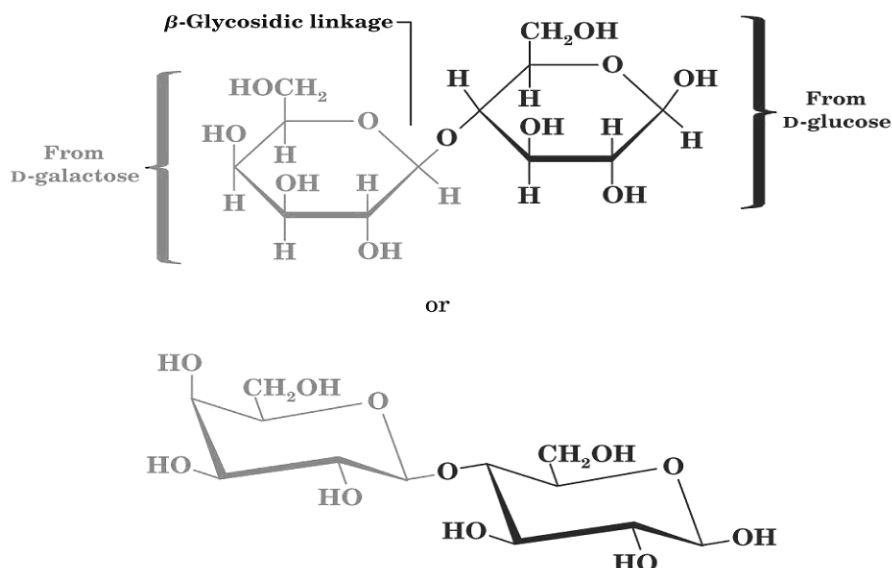
2.1.2. Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

5 až 7 % veškerého dusíku v mléce přechází do syrovátky ve formě nebílkovinných dusíkatých látek (především purinů). Jedná se o nepatrné příměsi močoviny, xantinu, guaninu, hypoxantinu, adeninu, kreatinu, kreatininu, alantoinu, rhodanidů, amoniaku aj. Proces zpracování syrovátky není těmito látkami nijak zásadně ovlivněn [12].

2.1.3. Mléčný cukr

Kvantitativně nejvíce je v sušině syrovátky zastoupena laktosa. Laktosa neboli mléčný cukr je disacharid sestávající z D-galaktosy a D-glukosy vázaných beta-glykosidickou vazbou. Vyskytuje se téměř výhradně v mléce savců (v kravském mléce 4,5 – 5%, v lidském maximálně 7 %). Mléčný cukr tvoří 70 až 80 % celkové sušiny syrovátky. V syrovátce je laktosa obsažena téměř ve stejném množství jako v mléce [4, 6, 14].

Laktosa patří mezi redukující disacharidy, a proto lze dokázat Tollensovým a Fellingovým činidlem. U savčích mláďat, která jsou krmena mlékem, je střevními klky vylučován enzym laktasa, který molekulu laktosy rozštěpí na dvě podjednotky [13].



Obr. 1: Struktura laktosy

2.1.3.1. Fyzikální vlastnosti

Vzhledem k asymetrickým uhlíkům se může molekula laktosy opticky otáčet a vyskytuje se ve dvou izomerech, které se liší konfigurací na poloacetalovém uhlíku. Mléčný cukr se v syrovátce nachází ve dvou izomerních formách a to nehygroskopické α -laktose a hygroskopické β -laktose. V roztoku je poměr mezi α -laktosou a β -laktosou 1:2. Přítomnost hygroskopické formy laktosy (β -laktosa) má za následek hygroskopičnost sušené syrovátky.

Obě formy se vyskytují jak bezvodé, tak i v podobě monohydrátu. Anhydrid může přecházet v hydrát a naopak. Laktosa krystalizuje pomalu v podobě bílých tvrdých krystalků. Izomerní α -laktosa krystalizuje jako monohydrát a při zahřívání okolo 130 °C se mění na anhydrid. Krystalizací z vodných roztoků při teplotě okolo 95 °C vzniká bezvodá β -laktosa [14,15].

Relativní sladivost laktosy je asi 20 % sladivosti sacharosy (koncentrace 5 %). Sladivost může být zvýšena hydrolýzou [14].

V organických rozpouštědlech jako je ethanol nebo methanol je mléčný cukr téměř nerozpustný. Krystalizaci laktosy z nevodných rozpouštědel (methanol, ethanol) lze získat stabilnější (méně hygroskopickou) formu bezvodé laktosy. Využívá se zde minimální rozpustnosti v etheru a chloroformu, rozpouští se však v pyridinu a za tepla i v kyselině octové, ze které se po ochlazení krystalizuje [14, 15].

Rozpustnost laktosy je závislá na teplotě, rozpouští se lépe při zvýšených teplotách. Přídavek solí má také vliv na rozpustnost laktosy ve vodných roztocích [14].

Tab. 2: Rozpustnost laktosy [14].

Teplota [°C]	Koncentrace nasyceného roztoku[g/100g H ₂ O]
30	24,0
50	44,0
70	77,8
80	98,9

2.1.3.2. Chemické vlastnosti

Poloacetalový hydroxyl zachovaný v glukosovém článku je původcem redukčních vlastností laktosy (patří mezi redukující cukry). Laktosa redukuje za studena kovové stříbro z Tollensova roztoku (amoniakální roztok oxidu stříbrného) a podobně jako glukosa také oxid měďný z Fehlingova roztoku (roztok hydroxidu měďnatého v roztoku alkalických solí kyseliny vinné). Redukce Fehlingova roztoku probíhá na rozdíl od glukosy až za tepla.

Oxidaci laktosy (např. bromovou vodou) vzniká kyselina laktobionová, která dále hydrolyzuje na D-galaktosu a kyselinu D-glukonovou. Oxidaci v silně alkalickém prostředí (var s NaOH, KOH) vznikají monokarbonové kyseliny, např. kyselina mravenci, octová, mléčná, popř. uhličitá.

Reakcí organických kyselin s ostatními hydroxyskupinami vznikají např. estery a ethery. V zásaditém prostředí za přítomnosti KMnO₄ dochází již za obvyčné teploty k úplnému rozkladu na vodu a CO₂. Oxidaci koncentrovanou HNO₃ vzniká kyselina šťavelová a uhličitá.

Laktosa působením zředěných minerálních kyselin hydrolyzuje na své složky – glukosu a galaktosu [12].



Laktosa je redukujícím cukrem, který při tepelném ošetření reaguje s aminoskupinami bílkovin za vzniku hnědých barviv (melanoidů). Tyto reakce silně závisejí na pH [4].

2.1.3.3. Výroba laktosy

Nejvhodnější surovinou pro její výrobu je permeát po ultrafiltraci syrovátky, další možností je odstranění bílkovin tepelnou denaturací nebo lze vycházet přímo z neodbílkované syrovátky. Permeát se zahustí na 60 % sušiny, v krystalizačních tancích a tím vzniká syrovátkový sirup. Řízenou krystalizací se krystaly oddělí na dekantační odstředivce (obsahují 99 % monohydrátu α -laktosy a asi 0,5 % syrovátkových bílkovin) a suší se ve fluidní sušárně. Rozpuštěním ve vodě při 80 °C, filtrací s aktivním uhlím a překrystalováním se získá rafinovaný monohydrát α -laktosy o vysoké čistotě (99,6 %) [2, 6].

β -laktosa krystalizuje při teplotě vyšší než 93,5 °C a nejčastěji se průmyslově vyrábí sušením vlhké α -laktosy na válcové sušárně [2].

2.1.3.4. Využití laktosy

Laktosa nachází uplatnění v kojenecké výživě, v cukrovinkách, dále jako tabletovací prostředek ve farmacii a jako složka živných médií. Laktosa je surovinou pro další modifikace (hydrolyza, redukce na laktitol) [2].

Laktosu mohou přijímat i diabetici. Zvýšení krevní glukosy je po podání laktosy nižší než v případě glukosy, ale vyšší než u fruktosy, což je možné využít i při regulaci hmotnosti [4].

2.1.3.5. Význam laktosy ve výživě člověka

Laktosa je využitelná jako zdroj energie. Má menší kariogenní a laxativní (projímavé) účinky [15].

Laktosa je mléčný cukr, který se hydrolyzuje v tenkém střevě enzymem laktasou na příslušné monosacharidy. V dětském věku tento enzym produkuje velká část lidské populace a během stárnutí může aktivita tohoto enzymu klesat. Vlivem chybějící či omezené produkce enzymu vzniká onemocnění tzv. laktosová intolerance. Nevyužitá laktosa se rozkládá vlivem bakterií na organické kyseliny, plyny a vodu, a ty způsobují intestinální potíže [16, 18].

Mléčné kvašené výrobky, jako jsou např. jogurty a acidofilní mléko, mohou bez problému konzumovat i lidé s intolerancí laktosy. Působením bakterií mléčného kvašení, které jsou vybaveny schopností vytvářet enzym laktasu (β -galaktosidasa) štěpí laktosu, která se přemění zejména na mléčnou kyselinu (L – nebo D-mléčnou kyselinu nebo racemát). Při fermentaci se vytvářejí určité výživově významné látky (vitamin B2, B12 atd.) Kyselina mléčná může být dále fermentována na jednoduché kyseliny, oxid uhličitý a vodu.

Laktosa je vhodná jako prebiotikum, tzn., může sloužit jako substrát schopný selektivně podporovat růst probiotických bakterií a tím znovu vytvářet střevní mikroflóru. Růst laktobacilů a potlačování patogenních mikroorganismů je podporováno kyselým prostředím v důsledku vznikající kyseliny mléčné. Laktosa může být jako prebiotikum využívána přímo nebo se z ní mohou vyrábět galaktooligosacharidy (GOS) či laktulosa [15 - 18].

Laktulosa je disacharid (galaktosa – fruktosa), který se získává izomerací laktosy (galaktosa –glukosa) v alkalické prostředí. Klinické testy na lidech prokazují, že nízké dávky laktulosity také pozitivně ovlivňují absorpci vápníku a hořčíku ze střev [17].

2.1.4. Tuk

V syrovátce tuk bývá přítomen v nepatrném množství nebo vůbec (v případě dokonalého odstředění syrovátkové smetany) [4].

2.1.5. Kyseliny

Nejvyšší obsah kyselin je v kyselé syrovátce z výroby tvarohu a jejich složení závisí na aktivitě a složení mikroflóry. V syrovátce se vyskytují především kyseliny citronová, mléčná, propionová, octová a mravenčí. Nejvyšší bývá obsah kyseliny citronové a kyseliny mléčné. Při výrobě kaseinu může do syrovátky přecházet i malé množství minerálních kyselin, např. chlorovodíkové [4].

2.1.6. Minerální látky a stopové prvky

Minerální látky jsou v syrovátce obsaženy ve formě organických a anorganických sloučenin. Největší podíl tvoří draselné a vápenaté soli kyseliny fosforečné, mléčné, uhličitě, citronové, příp. chlorovodíkové a sírové. Vyšší obsah vápníku se vyskytuje v kyselé syrovátce (výroba tvarohu), protože při výrobě sýra se část vápníku váže na kasein a přechází do sýra. Dále pak ve významném množství obsahuje, kromě draslíku a vápníku, sodík, hořčík, zinek, síru a chlór. Ve stopovém množství (v $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$) je v syrovátce dále obsaženo především železo, jód, měď a kobalt [4].

2.1.7. Vitaminy

Obsah vitaminů, který přechází z mléka do syrovátky, není zanedbatelný. Největší podíl vitaminů je rozpustných ve vodě (cca 88 % thiaminu, veškerý riboflavin, 78 % kyseliny askorbové, 90 % kyseliny nikotinové, až 60 % kobalaminu), ale obsahuje i menší množství vitaminů rozpustných v tucích. Sывátka je tedy dobrým zdrojem především vitaminů skupiny B, vitamínu C a vitamínu A [4].

Tab. 3: Vitaminové složení sušené syrovátky

Vitamin	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Vitamin A (MJ/100 g)	69–240	47–165
Vitamin C (mg/100 g)	0–9,08	0–0,99
Vitamin B6 (mg/100 g)	0,36–0,77	0,46–0,96
Vitamin B12 (μg/100 g)	0,9–3,7	1,5–3,7
Vitamin E – tokoferol (μg/100 g)	14–249	19–169
Vitamin B1 – thiamin (mg/100 g)	0,38–0,59	0,35–0,58
Vitamin B2 – riboflavin (mg/100 g)	1,70–2,92	1,57–2,35
Kyselina pantotenová (mg/100 g)	8,2–15,0	7,0–14,2
Biotin (μg/100 g)	8,2–15,0	7,0–14,2
Niacin (mg/100 g)	0,76–2,03	0,61–2,51
Kyselina listová (μg/100 g)	4,2–30,0	14,6–59,4
Cholin (mg/100 g)	62–173	60–171

2.1.8. Produkty ze syrovátky určené k dalšímu využití

Sывátku lze zpracovávat do formy různých konečných produktů. Největší podíl se použije k výrobě syrovátkového prášku, laktosy a bílkovinných syrovátkových koncentrátů (65 – 75 %), zbytek tvoří speciální syrovátkové produkty (laktoglobuliny, laktalbuminy, laktoferrin, laktoperoxidáza, osteopontin, imunoglobuliny, tagatosa, laktulosa, glykomakropeptidy (GMP), galaktooligosacharidy (GOS), nisin, aj), které se vyznačují vysokou přidanou hodnotou. Jejich zisk vyžaduje náročné technologické postupy, proto tvoří na trhu zatím jen nepatrný zlomek výroby [20].

Sušení syrovátky je tradiční postup k prodloužení trvanlivosti syrovátky a k přiměřenému snížení nákladů na přepravu. Sušená syrovátka, pokud není demineralizovaná, má využití stále především v krmivářství, jen někdy jako částečná náhrada sušeného mléka při výrobě sýrů a jiných mléčných výrobků. V případě demineralizované syrovátky se ze syrovátky odstraní část solí, jejichž poměrně vysoký obsah negativně ovlivňuje možnosti výroby i využití do krmiv a do potravin. Pro zkrmování stačí 60% odsolení, pro lidskou výživu se používá vyššího odsolení [4].

Bílkoviny označené jako syrovátkový koncentrát (WPC) lze získat ze syrovátky tepelnou denaturací nebo v současné době z nutričního hlediska šetrnějšími a selektivnějšími separacemi. K modernějším postupům separace patří především membránové techniky. WPC se často přidává do potravinářských výrobků přímo za účelem jejich obohacení o bílkoviny nebo za účelem využití určitých funkčních vlastností. Čistší forma koncentráту (WPC), kde je podíl bílkovin v sušině přibližně 90 %, je tzv. izolát syrovátkových bílkovin (WPI) [4].

Odstraněním bílkovin ze syrovátky vzniká syrovátkový permeát, který je především zdrojem laktosy. Využívá se v krmivářství nebo se zpracovává na další produkty fermentací, sušením v kombinaci s krystalizací, nebo se z něho vyrábějí sirupy či další sladidla. Laktosa se ze syrovátky získává především krystalizací permeátu [4].

Tab. 4: Hlavní funkční vlastnosti nejvýznamnějších syrovátkových produktů [4].

Sušená syrovátka/sušený permeát (nehygrokopický prášek)	Vliv na barvu a chuť, na obsah sušiny
Krystalická sladká syrovátka	– vliv na chuť mléčných výrobků, na obsah sušiny, na rozpustnost a dispergovatelnost
WPC 35	– zvýšení obsahu bílkovin, vliv na emulgovatelnost, rozpustnost, chuť a barvu
WPC 80	– značné zvýšení obsahu bílkovin, vliv na emulgovatelnost, šlehatelnost, vaznost s tuky či s vodou, rozpustnost, termostabilitu/zahuštění
Laktosa	– vliv na udržování vlhkosti, na konzistenci, chuť a barvu, jako nosič

2.1.9. Aplikace syrovátky a syrovátkových produktů

Využívání syrovátky a jejích složek patří jednoznačně k trendům zdravého životního stylu. Nezanedbatelným faktorem je také nízká cena syrovátky, vysoká výživová hodnota a široká paleta fyzikálně-chemických vlastností [21].

Tab. 5: Použitelnost syrovátkových výrobků do potravin [4].

Skupina potravin	Důvod použití
Mléčné výrobky: zmrzliny, jogurty, pomazánky, sýrové výrobky, nápoje	– zvýšení sušiny, emulgovatelnosti, viskozity, šlehatelnosti
Výrobky z masa a ryb: mletá masa, klobásy	– zvýšení vaznosti vody, emulgace tuku, zahuštění
Pekařské výrobky: chleba, pečivo, sušenky	– zlepšení barvy, chuti, konzistence, termostability
Snacky	– zlepšení stravitelnosti
Nápoje: kávová smetana, speciality	– zlepšení rozpustnosti, viskozity, stravitelnosti, chuti, obsahu bílkovin a vápníku

Syrovátkové produkty nacházejí uplatnění v širokém sortimentu potravin, často jako částečná náhrada sušeného mléka při výrobě jogurtů, zmrzlin, sýrů. Syrovátkové bílkoviny mohou být přidány do jogurtů jako stabilizátory např. v množství 3 až 5 %. Vysoká schopnost vázat vodu umožňuje snížit podíl sušiny odtučněného mléka a příp. dalších stabilizátorů [4, 21].

Syrovátkové bílkovinné produkty se často používají při výrobě sýrů. Výhodou je částečná náhrada této cenné bílkoviny z levné suroviny. Sýrům takovýmto způsobem získaným propůjčuje osobitý charakter. Kromě toho se používá přímo syrovátka nebo syrovátkový bílkovinný separát (buď s přídavkem mléka, nebo bez přídavku) k výrobě syrovátkových sýrů. Tyto sýry mohou být dvojího druhu. Sýr „Ricotta“ (někdy též označovaný jako „syrovátkový tvaroh“) obsahuje 70–80 % vody a syrovátkové bílkoviny hlavně vysrážené teplem. Druhým je hnědý syrovátkový sýr norského typu „Mysost“, v němž převažuje laktosa (33–45 % podle druhu produktu) [4, 6].

Určitá podobnost vlastností syrovátkových a vaječných bílkovin je předpokladem k využití syrovátky k náhradě vajec v potravinářských výrobcích k úpravě viskozity a textury [4].

Sušená syrovátka a její deriváty (včetně WPC, WPI a krystalické laktosy) jsou vhodnou pekařskou ingrediencí nahrazující část mléka a dalších složek. Přídavkem syrovátky se zvyšuje nejen nutriční hodnota výrobku, ale zlepšují se i některé další jakostní parametry. Přídavkem syrovátky se zvyšuje hladina bílkovin v pekařských výrobcích. Syrovátka s poměrně vysokým obsahem lyzinu dobře kompenzuje nízký obsah této aminokyseliny v pšenici. Bílkoviny sušené syrovátky nebo syrovátkových preparátů mohou také tvořit struktury (gely), které se teplem zhutňují, čímž se může zvyšovat síla lepku. Emulgační schopnosti syrovátkové bílkoviny také umožňují úsporu tuku v recepturách. Syrovátková laktosa má příznivý vliv na zadržování vlhkosti a zlepšení zpracovatelnosti těsta, protože je kvasinkami jen velmi pomalu štěpena, a tak zůstává přítomna i během pečení. Společně s bílkovinami má tak vliv na snížení rychlosti vysychání při stárnutí pečiva. Typickým účinkem laktosy je rychlejší nástup kynutí a lepší zadržování plynu. Syrovátková kombinace laktosa/bílkovina přispívá významně k hnědnutí pekařských výrobků, což je obzvláště oceňováno u výrobků s nízkým obsahem cukru. Získaná zlatohnědá barva je stálá. Zatímco sladká syrovátka se v pekárenské výrobě běžně používá, použití kyselé syrovátky je obvykle omezeno na kvas a podobné produkty, kde vyhovuje její chuťový a aromatický profil [4, 22].

Koncentrátem syrovátkových bílkovin a vodou lze nahradit část masa v masných výrobcích, čímž se sníží obsah tuku a energie, sníží se náklady a zachová se vaznost vody a tuku a obvyklá textura. Předností je větší stabilita nízkotučných výrobků vůči oxidaci [23]. Náhražky masa se obvykle vyrábějí extruzí texturovaných rostlinných bílkovin (např. směsi sojové mouky se škroby). Alternativou může být obdobný postup s použitím texturovaného WPI. Vaznost se podobá vaznosti masa. Při snížení obsahu tuku ve výrobcích se zachovává textura a pocit plnosti v ústech odpovídající tučným výrobkům [4].

Ze syrovátkových bílkovin polymerací lze vyrobit jedlé folie, které jsou využitelné pro řadu aplikací. Mohou být použity vzhledem ke svým bariérovým vlastnostem jako povlaky či obaly potravin, přičemž cílem je prodloužení údržnosti a zlepšení kvality. Využije se tak levný přírodní polymer a dojde k ekologicky významnému snížení využívání syntetických obalových materiálů. Fólie má vynikající bariérové vlastnosti vůči kyslíku, aromátu a olejům. Propustnost pro vlhkost je střední až vysoká, na rozdíl od fólie z kaseinu, která je pro vlhkost vysoce nepropustná. Na permeabilitu fólií z WPI pro O₂ má vliv zvýšená vlhkost prostředí, takže je nutné je skladovat při střední nebo nízké relativní vlhkosti. Vzhledem k schopnosti zabránit pronikání kyslíku, mohou mít tyto obalové materiály významné využití při ochraně potravin před oxidací a žluknutím. Potenciální použití má taková fólie např. jako jedlý povlak ořechů (k zabránění pronikání olejů z ořechů do jiných složek potraviny) nebo k ochraně před polámaním u citlivých produktů, jako jsou snídaňové cereálie nebo lyofilizované výrobky.

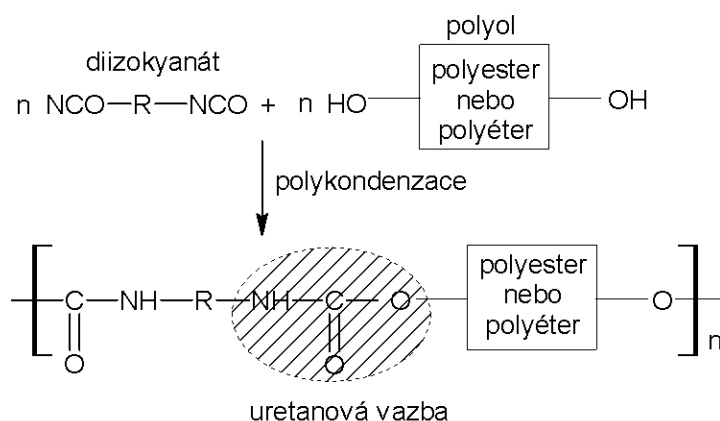
Použit se dá na ořechy, kandované ovoce nebo na oplatky přidávané do zmrzlin, a to kvůli udržení jejich křupavosti [4].

Syrovátka či syrovátkové produkty mohou být použity také k výrobě nápojů. Zájem o syrovátkové nápoje stoupá především u žen, které je konzumují hlavně kvůli nízkému obsahu energie, příznivému účinku na trávicí trakt a řadě fyziologických účinků jednotlivých složek [4].

Fermentace syrovátky hlavně díky vysokému podílu přítomné laktosy (příp. po rozštěpení, glukosy a galaktosy) může sloužit k produkci biomasy – především pro krmné účely, etanolu, bioplynu, k produkci organických kyselin, vitaminů, enzymů, polysacharidů a lipidů [4].

2.2. Polyuretany

Polyuretany, nazývané též polykarbamáty, jsou polymerní látky, které vznikají polyadiční reakcí diizokyanátů a polyalkoholů (na bázi polyesterů či polyéterů). Charakteristickou vazebnou jednotkou je uretanová vazba —NH—CO—O— . Adicí hydroxylové skupiny (—OH) na izokyanát (—NCO) vzniká uretanová strukturní jednotka (—NH—CO—O—), která je z formálního hlediska esterem kyseliny karbamové [24].



Obr. 2: Polyuretanová vazba

Polyadiční reakce je reakcí exotermickou, při které musíme odvodem tepla regulovat teplotu v reaktoru. Tato teplota, spolu s dobou setrvání v roztaveném stavu a molárním poměrem diizokyanátu k diolu, výrazně ovlivňuje střední molární hmotnost vyráběného polymeru. Lineární polyuretany mají střední molární hmotnost většinou v rozsahu od 7 kg.mol^{-1} do 12 kg.mol^{-1} . Přesáhne-li její hodnota 15 kg.mol^{-1} , jsou již polymery částečně slabě sesíťovány [25].

Na základě relativně jednoduchého chemismu vzniku PUR a vhodnou kombinací výchozích látek lze získat široké spektrum PUR s rozdílnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, od lineárních přes flexibilní, až po vysoce síťované a tuhé PUR [27].

Výchozími látkami pro výrobu PUR jsou izokyanáty, polyoly, síťovací činidla, katalyzátory, aditiva a nadouvadla, stabilizátory, retardéry hoření, plniva, antioxydanty, surfaktanty.

Izokyanáty mohou být jak alifatické nebo aromatické, tak i heterocyklické sloučeniny s funkční skupinou –NCO. Na Hmotnostním podílu izokyanátové složky závisí tuhost vzniklé PUR. V případě přebytku diizokyanátu, vznikají tuhé PUR, které mají ještě volné izokyanátové skupiny schopné dalších reakcí. Přebytek polyolu, který tvoří s izokyanáty vysoce síťovanou strukturu, působí v PUR jako změkčovaadlo.

Izokyanáty kromě reakce s vodou za vzniku CO_2 (působí jako nadouvadla), reagují také s aminy za vzniku substituovaných močovin, které propůjčují PUR tuhost a tepelnou stabilitu. Reakce vzniku PUR je exotermní, vzniklé teplo vypaří inertní nadouvadla a tím dotvrzuje pěny. Nejvíce izokyanáty reagují se sloučeninami s alespoň jedním aktivním (tj. potenciálně vyměnitelným) vodíkem. Polyoly jsou obecně reaktivní sloučeniny (na bázi polyéteru nebo polyesteru), obvykle kapaliny, které obsahují nejméně dvě funkční skupiny nesoucí aktivní vodík. Polyéterpolyoly dávají obecně měkčí, houževnatější PUR s lepší hydrolytickou odolností, než polyesterpolyoly, které naproti tomu vykazují vyšší pevnost v tahu a lepší odolnost. Měkké PUR vznikají z polyolů o střední molekulové hmotnosti a nízkém stupni větvení, zatímco tuhé PUR vznikají z nízkomolekulárních polyolů, které jsou vysoce rozvětvené [24].

2.2.1. Vlastnosti

Většina polyuretanových produktů má charakter termosetů. Základními vlastnostmi je extrémní odolnost vůči oděru, dobrá adheze k řadě materiálů včetně kovových a polymerních a stálost v prostředí vody a zředěných vodných roztoků kyselin i zásad [24, 25].

Velkou předností polyuretanů je možnost zpěňování reakcí izokyanátové skupiny s vodou za současného uvolnění CO_2 a vzniku různě napěněného elastomeru [26].

2.2.2. Využití

Polyurethany dosáhly v krátké době svého vývoje rozsáhlého použití nejen jako lehčené a nelehčené plasty a vlákna, ale také v oblastech elastomerů, poromerů (syntetických usní), lících pryskyřic, lepidel, nátěrových hmot, montážních pěn (tuhnoucích vzdušnou vlhkostí po vypuštění z hermeticky uzavřené tuby), dokonce se uplatnily i jako materiál k výrobě pneumatik [25].

Snad nejznámější pro širokou veřejnost je použití polyuretanů k výrobě lehčených hmot (pěnových materiálů). Měkké pěny se vyrábějí v rozmezí hustot od 15 kg.m^{-3} do 70 kg.m^{-3} , tvrdé v ještě větším, již od 10 kg.m^{-3} do 600 kg.m^{-3} . Tvrdé pěny se připravují buď v uzavřených, nebo otevřených formách; slouží většinou jako izolační materiál ve stavebnictví a strojírenství (chladničky, automobily). Měkké pěny se připravují výhradně v blocích; používají se jako matrace, k laminování textilu, pro obalové účely (ochrana proti nárazu), k výrobě izolačních a těsnících pásků apod. [25, 26].

Polyuretanové elastomery mají uplatnění ve výrobě těsnění, pohonných řemenů, podešví, příp. celých lyžařských bot. Pro podlahoviny, povrchy sportovních drah nebo povrchy startovacích drah letadel se využívají polyuretanové lící pryskyřice [26].

2.2.3. Biodegradace polyuretanů

Většina PUR jsou termosety, které není možno jednoduše recyklovat roztavením a znovu zformováním. Je tedy nutná jejich pracná degradace. Biodegradace polymerních materiálů je proces degradace, při kterém dochází k odbourávání polymerních organických látek působením biologických činitelů, především mikroorganismů, hmyzu, hlodavců a rostlin. Význam biodegradčních postupů spočívá v tom, že na rozdíl od fyzikálního, či chemického odbourávání méně poškozuje přírodu a umožňuje likvidovat velký rozsah škodlivých látek. Jde o metodu alternativní klasickým metodám spalování, solidifikace, chemického degradace, chemisorpce atp. [29].

2.2.3.1. Proces a podmínky biodegradace

Biodegradací dochází k rozkladu nebo transformaci různých nežádoucích chemických sloučenin na látky méně nebezpečné, v ideálním případě na CO_2 a vodu. Technologie mikrobiální dekontaminace složek životního prostředí jsou založené na schopnosti mikroorganismu spotřebovávat (utilizovat) kontaminující látky jako zdroje uhlíku a energie pro základní životní funkce, nebo transformovat polutanty na jiné sloučeniny v přítomnosti kosubstrátu. Degradční procesy, ve kterých mikroorganismy využívají organické látky, mohou být aerobní i anaerobní [28, 29].

Vlastním biotickým činitelem způsobujícím štěpení PUR jsou enzymy produkované organismy, např. peptidáza, která může štěpit polyamidovou vazbu a dokonce i vazbu esterovou. Extracelulární enzymy mikroorganismů rozštěpí polymer na menší jednotky – oligomery, dimery a monomery, které jsou dost malé na to, aby prošly přes permeabilní membránu do buňky a byly asimilovány jako zdroj uhlíku a energie. Mikrobiální aktivita mění zároveň strukturu látek kultivačního média. Za aerobních podmínek degradace vznikají jako produkty štěpení polymeru obecně CO_2 , H_2O a mikrobiální biomasa. Za anaerobních podmínek pak kromě CO_2 , H_2O mohou vznikat také organické kyseliny, metan, případně jiné produkty anaerobní biodegradace. Kompletní biodegradace polymeru jak za aerobních, tak anaerobních podmínek je vzácný jev. Mineralizace polymeru může jen těžko dosáhnout stoprocentní úspěšnosti, protože současně dochází k tvorbě biomasy a humusu. Proces enzymatického štěpení podporují i abiotické vlivy degradace (fotodegradace, mechanické narušení, rozpuštění, pH a teplota prostředí, aj.) [30, 31].

Zpočátku je biodegradace pomalá nebo nemožná vlivem malého povrchu PUR materiálu (velké kousky), nebo příliš hustým zesíťováním a velikostí makromolekuly. Od určitého stupně zesíťení, kdy enzymy už nepronikají hlouběji do materiálu, probíhá degradace pouze povrchově a dochází k výraznému zpomalení procesu. Je tedy vhodná kombinace s jinou metodou degradace, např. fyzikální (mletí), která sníží molekulovou hmotnost polymeru a rozruší jeho strukturu. Míra degradace je ovlivňována zejména těmito vlivy prostředí: teplota, světlo, živiny, pH, vlhkost a přítomnost kyslíku [30]

Biodegradabilita polyuretanů není pouze ovlivněna biotickými a abiotickými faktory degradace, závisí také na fyzikálních a chemických vlastnostech materiálu.

- **Chemické složení** – přítomnost C, H, N, O ve struktuře polymeru podporuje růst mikroorganismů a biodegradabilitu polymeru.
- **Strukturní jednotnost** – monomerní jednotky obsahující různé chemické struktury a chemické vazby vyžadující k biodegradaci kooperaci více enzymů.

- **Strukturní podobnost** – funkční skupiny a chemické vazby nacházející se v přírodních polymerech, jako jsou například amidická nebo esterová vazba, jsou obecně snadněji biodegradovatelné působením mikroorganismů a enzymů.
- **Molekulová hmotnost** – vzrůst molekulové hmotnosti je spojen s klesající biodegradabilitou polymeru. Ve většině případů mikroorganismy nedegradují syntetické polymery, jejichž relativní molekulová hmotnost je vyšší než 20 000.
- **Zesítení** – i když se při zesítení redukuje krystalická struktura polymeru, dochází k inhibici penetrace enzymů do polymeru a tím i ke snížení biodegradability polymeru.
- **Flexibilita řetězce** – flexibilní řetězce umožňují tvorbu komplexu enzym – substrát a tím zvyšují biodegradabilitu polymeru.
- **Přítomnost hydrofilních funkčních skupin** – hydrofilní skupiny zvyšují pravděpodobnost enzymatické reakce, protože zvyšují rozpustnost polymeru, případně alespoň umožňují přístup vody (voda je pro většinu biodegradačních reakcí nezbytná).
- **Krystalické struktury** – amorfni oblasti jsou snadněji biodegradovatelné, krystalické materiály mohou být biodegradovány pouze na povrchu, protože enzymy nemohou penetrovat do pevné struktury krystalů.
- **Porozita materiálu** – se vzrůstající porozitou materiálu vzrůstá také velikost povrchu, na kterém může docházet k vytváření komplexu substrát-enzym.
- **Typ kontaktu** – nejlepší podmínky pro biodegradaci jsou v roztoku.
- **Koncentrace substrátu** – pro enzymy jsou optimální podmínky ve zředěných roztocích.

Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje biodegradabilitu syntetických polymerů, je přítomnost aditiv, plastifikátorů a stabilizátorů [32].

2.2.3.2. *Vliv biodegradace na vlastnosti polymerů*

Vlivem biodegradace dochází ke změnám fyzikálních, chemických a také mechanických vlastností degradovaného materiálu. Toho se využívá při studiu biodegradability polymerních materiálů [33].

Hlavním projevem při biodegradaci polyuretanů je úbytek hmotnosti materiálu. V průběhu biodegradačních procesů dochází také k dalším změnám ve vlastnostech materiálu, jako je třeba pokles molekulové hmotnosti polymeru anebo změna mechanických vlastností (pružnosti v tahu atd.). Dochází-li v průběhu růstu mikrobů na polymeru především k utilizaci plastifikátorů, ztrácí materiál své mechanické vlastnosti (v důsledku ztráty aditiva) a hmotnost. Může také docházet k poklesu stability v důsledku ztráty stabilizátorů. Dalším ukazatelem míry degradace materiálu jsou změny struktury povrchu, které je možno pozorovat rozličnými mikroskopickými technikami [33].

Pro sledování chemických nebo fyzikálních změn se často využívají různé analytické instrumentální metody, jako infračervená spektroskopie, UV spektroskopie, NMR, rentgenová difraktoimetrie aj.

Vizuálním projevem biodegradace může být i tvorba barevných skvrn, způsobených použitou mikrobiální kulturou, jenž za určitých podmínek produkuje pigmenty [34].

2.3. Termofilní mikroorganismy

Vývoj a činnost mikroorganismů je závislá na vnějším prostředí. Je potřeba nejen dostatečné množství surovin pro syntézu buněčné hmoty, dostatečné množství zdroje využitelné energie, ale i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Teplota je jedním z hlavních faktorů ovlivňující život a rozmnožování mikroorganismů. Pro mikroorganismus rozeznáváme tři základní body teploty, tzv. minimální teplotu (nejnižší teplota, při které se daný druh rozmnožuje ještě zjistitelnou rychlostí), optimální teplotu [při této teplotě se rozmnožuje největší rychlostí] a maximální teplotu (nejvyšší teplota, při níž je mikroorganismus schopen se ještě rozmnožovat). Podle vztahu k teplotě rozdělujeme mikroorganismy do na psychofilní, mezofilní, termofilní, hypertermofilní.

Jako termofilní mikroorganismy se označují všechny mikroorganismy, které mají optimální teplotu růstu 45 až 60 °C, někdy i vyšší. Některé mohou růst výjimečně i při teplotě až 100 °C (archeabakterie). Řada termofilních mikroorganismů se nerozmnožuje při teplotách 28 až 30 °C, dokonce ani při teplotách nižších než 40 °C, kdežto jiné se při teplotách kolem 30 °C rozmnožují ještě zjistitelnou rychlostí [35].

2.3.1. Adaptace na vysoké teploty

Termofilní mikroorganismy jsou zajímavé hlavně z důvodu, že většina z nich žije a aktivně se rozmnožuje při teplotách, které jinak působí ničivě na běžné organismy. Při těchto teplotách dochází u psychofilních a mezofilních mikroorganismů již k denaturaci bílkovin. Termofilní bakterie se vyznačují mimořádně vysokou metabolickou aktivitou a rychlostí růstu za optimální teploty. Vysoká metabolická aktivita při těchto teplotách je výsledkem odlišného složení bílkovinných složek jejich enzymů, neboť optimální teplota většiny izolovaných enzymů se pohybuje v rozmezí optimálních teplot pro růst. Část enzymů termofilních bakterií ztrácí svou aktivitu po rozdušení buněk, což svědčí o ochranných účincích některých složek buňky vůči vysokým teplotám [35].

Příčinou vysoké tepelné stability proteinů termofilních mikrobů je tvorba solných můstků a vodíkových vazeb mezi bočními řetězci substituovaných zbytků. Také dochází k přeskupení a úbytku aminokyselin v porovnání s „netermofilními“ enzymy, což vede ke konformačním a strukturním změnám v prostorovém uspořádání proteinů. Odolnost vůči vysokým teplotám je také dána vysokým obsahem fosfolipidů a lipidů obsahujících nasycené mastné kyseliny [32].

2.3.2. Výskyt termofilních mikroorganismů

Termofilní mikroorganismy mají nároky na vysoké teploty, a proto ke svému růstu vyžadují termální prostředí. Toto prostředí může v přírodě vznikat solárním ohřevem, spalovacími procesy, radioaktivním rozpadem a geotermální aktivitou.

Nejčastější termálních prostředí tvoří geotermální aktivita. V aktivních vulkánech je teplota pro život organismů příliš vysoká (nad 100 °C), ale horké prameny, které souvisí se sopečnou činností, mají vhodné teplotní podmínky pro život termofilních mikroorganismů. Teplota těchto pramenů se pohybuje od 30 °C až po bod varu (90 – 100 °C) v závislosti na nadmořské výšce). Solární ohřev půdy je možný do teplot okolo 60 °C, zejména v pouštních oblastech. K výraznějšímu zvýšení teploty ve vodném prostředí dochází pouze v mělkých vodách nebo ve vodách s neobvyklou hustotou. Spalovacími procesy se tvoří v přírodě největší množství tepla. Mohou být vyvolány procesy biologickými i nebiologickými. Tepelná energie může vznikat činností mikroorganismů, např. při kompostování organických odpadů, kde může teplota dosahovat 70 °C i více [36].

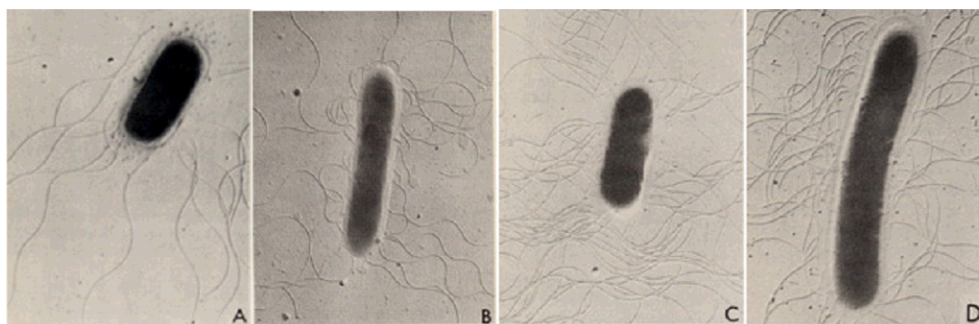
Termofilní mikroorganismy se vyskytují v půdě, v kompostech, v chlévské mrvě, v uskladněném vlhkém materiálu (rašelině, seně, obilí), tedy všude tam, kde činnost mezofilních mikroorganismů přispěla ke zvýšení teploty na 40 až 45 °C. Při této teplotě začíná intenzivní činnost termofilů, jež vede k dalšímu zvyšování teploty a někdy i k samovznícení (např. u sena, rašeliny nebo obilí). Samovznícení je způsobeno tvorbou lehece zápalných zplodin metabolismu termofilních bakterií [35].

2.3.3. Termofilní bakterie

Termofilní bakterie zahrnují zástupce z různých sekcí bakterií, není tedy možné jejich přesné taxonomické zařazení. Některé rody jsou čistě termofilní, u jiných jsou termofilní jen některé druhy. Pro jejich vlastnosti se tedy využívají směsné kultury. Jejich výhodou je v menších výživových požadavcích, rozšířeném spektru využívaných látek a jejich vzájemné vztahy [37].

2.3.3.1. Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je rod grampozitivních aerobních nebo fakultativně aerobních peritrichiálně tyčinkovitých bakterií z čeledi *Bacillaceae* [37, 45].



Obr. 3: Jednotlivé buňky pohyblivých bakterií na agaru (15 000krát zvětšeno), A.- *B. subtilis*; B. - *P. polymyxa*; C. - *B. laterosporus*; D. - *P. alvei*.

Pro čeleď *Bacillaceae*, do níž rod *Bacillus* patří, je velice významným taxonomickým znakem tvorba jedné endospory, která se vyznačuje velkou odolností k vysokým teplotám, jedům, zářením a jiným nepříznivým podmínkám [38].

Většina členů rodu je bez zbarvení, ale dokáže tvořit i barevné pigmenty. Nejčastěji žluté, oranžové, červenohnědé až hnědé. Tvorba různých pigmentů závisí nejen na druhu rodu, ale i na použitém kultivačním mediu [38].

Tab. 6: Rozdíly mezitím endosporami a vegetativními buňkami

Vlastnost	Vegetativní Buňky	Endospory
Cytoplazmatická vodní aktivita	Vysoká	Velmi Nízká
Enzymatická aktivita	Přítomna	Nepřítomna
Makromolekulární syntéza	Přítomna	Nepřítomna
Teplý odpor	Minimální	Vysoká
Odpor Vůči chemikáliím a kyseliny	Minimální	Vysoká
Rezistence Vůči Záření	Minimální	Vysoká
Citlivost na lysozym	část citlivá; část odolná	Odolná
Citlivost k barvení	Citlivá	Odolná

Vzhledem ke schopnosti degradovat velkou skupinu biopolymerů (bílkoviny, škrob, pektin, agar, uhlovodíky, atd.), hrají termofilní bakterie významnou roli v koloběhu uhlíku a dusíku v přírodě. Jsou také často zodpovědné za rozklad potravin. Kromě degradace většiny substrátů pocházejících z rostlin a zvířat jsou tyto bakterie schopny produkovat antibiotika polypeptidové povahy, z nichž některá se pomocí těchto bakterií vyrábějí průmyslově (např. bacitracin), můžou být dále také schopny nitrifikace a denitrifikace, fakultativní lithotrofie, autotrofie, parazitismu, aj.

Všeobecně je rod *Bacillus* převážně chemoheterotrofní, schopný využívat, díky svému enzymatickému vybavení, širokou paletu jednoduchých organických sloučenin (cukry, aminokyseliny, organické kyseliny). V některých případech také kvasí karbohydráty a produkuje glycerol a butandiol [37].

Vzhledem k rezistenci endospor k environmentálnímu stresu a schopnost dlouhodobého přežití v nepříznivých podmínkách jsou bakterie rodu *Bacillus* v prostředí všudypřítomné. Nicméně primární lokalitou těchto aerobních bakterií je půda. Několik druhů také dokáže parazitovat v hmyzích larvách, nebo působí onemocnění zvířat a lidí (antrax) [37, 38].

2.3.3.2. Rod *Thermus*

Rodu *Thermus* jsou termofilní, gramnegativní, aerobní, žlutě zbarvené bakterie heterotrofního charakteru. Bakterie rodu *Thermus* jsou aktivnější i termostabilnější při vyšších teplotách než většina ostatních mikroorganismů. Optimální podmínky k růstu se pohybují kolem teploty 70 °C a pH v rozmezí 7,5 – 8 [44].

Jako substrát pro růst využívá v první řadě uhlovodíky, aminokyseliny, karboxylové kyseliny a peptidy. Rod *Thermus* potřebuje zdroj uhlíku ve formě monosacharidů, i když většinou nemetabolizuje pentosy [39].

2.3.4. Využití termofilních bakterií k čištění odpadních vod

Termofilní bakterie mohou být využity při procesu čištění odpadních vod. V čistíčkách odpadních vod se využívá schopnosti těchto bakterií odbourávat organické látky, které jsou jednou z hlavních složek podílejících se na znečištění [40].

Biologické aerobní termofilní systémy jsou poměrně nový způsob úpravy odpadních vod. Princip metody spočívá v metabolickém odbourávání znečišťujících látek termofilními organismy. Z pohledu biologického čištění odpadních vod se za termofilní považují procesy probíhající při teplotě 45 °C a vyšší. To odlišuje vysokoteplotní procesy od procesů přechodných, jako je například zahnívání kalu (35 – 40 °C) [4].

Výhody termofilních aerobních procesů spočívají především v rychlé inaktivaci patogenů, vysoké biodegradační rychlosti spojené s nízkými růstovými výtěžky. Nevýhody spočívají především ve vysokých výdajích na aeraci a udržení teploty. Problém představuje také slabá flokulace bakterií a pění [4].

2.3.5. Význam v potravinářství

Termofilní mikroorganismy mají značný význam v potravinářském průmyslu. Pozitivní využití nacházejí ve výrobě sýrů, jogurtu či kyseliny mléčné. Bakterie termofilních kyselinových kultur jsou charakteristické pro mléko a mléčné produkty a jen výjimečně se izolují z jiných substrátů [41].

Výroba kyseliny mléčné se provádí pomocí bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus bulgaricus*), kdy se laktosa při teplotách vhodných pro konkrétní bakterie přemění na kyselinu mléčnou. Ta se během fermentace neutralizuje např. uhličitanem vápenatým. Po prokvašení se médium zahřeje, zfiltruje, filtrát se zahustí, mléčnan vápenatý se převede pomocí kyseliny sírové na kyselinu mléčnou a nerozpustný síran vápenatý, který se oddělí. Z takto získané kyseliny mléčné lze rafinací získat látku v potravinářské jakosti [42].

Při výrobě potravin mohou mít tyto mikroorganismy na potraviny i negativní vliv. Tzv. zbytková mikroflóra, což jsou v podstatě termofilní mikroorganismy, působí zkázu tepelně sterilovaných konzerv popř. jejich bombáž při nevhodném uložení. [43].

2.4. Analytické metody

2.4.1. VIS Spektrofotometrie

Spektrofotometrie patří mezi optické metody, které jsou založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením. Podstatou je absorpce viditelného záření (400 – 800nm) zředěnými roztoky molekul [47].

Základním vztahem využívaným v kvantitativní spektrometrii je Lambertův – Beerův zákon:

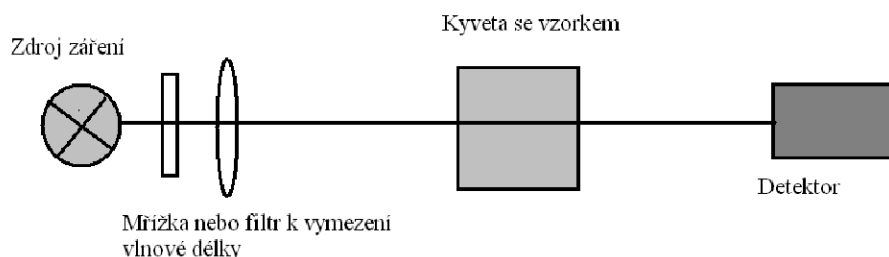
$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c \quad (2)$$

kde A je absorbance dané látky při vlnové délce λ , ϵ je molární absorpční koeficient dané látky při vlnové délce λ ($1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), l je tloušťka absorpční vrstvy (cm) a c je látková koncentrace dané látky (mol.l^{-1}).

Zavedení fyzikální absorbance souvisí s tím, že právě takto definovaná veličina je lineárně závislá na látkové koncentraci absorbující látky [49].

2.4.2. Turbidimetrie

Tato metoda patří mezi optické metody a spolu s nefelometrií jsou založeny na principu měření rozptylu světla v suspenzích a koloidních roztocích. Zeslabení primárního paprsku zředěnými systémy je velmi malé, proto je turbidimetrie vhodnější pro koncentrovanější systémy, zatímco nefelometrie je používána pro systémy zředěné, příp. slabě zakalené. Metody se od sebe liší také v umístění detektoru. V turbidimetrii je detektor v ose paprsku a měří záření prošlé vzorkem, které je ochuzené o rozptýlenou složku záření [46, 47].



Obr. 5: Základní schéma turbidimetru

Pokles intenzity světelného toku je analogický poklesu při absorpci světla a platí vztah obdobný Lambertovu – Beerovu zákonu.

$$\text{Log } (y/y_0) = e_T \cdot c \cdot l \quad (3)$$

kde y_0 – dopadající světelný tok, y – prošlý světelný tok, e_T - turbiditní koeficient, c - koncentrace, l - světelná dráha (tloušťka) měřicí kvety.

Výsledky měření značně ovlivňují podmínky stanovení. Hlavní vliv na změřené hodnoty má velikost a tvar částic. Při turbidimetrických měřeních je obtížné připravit reprodukovatelně suspenzi měřené reakční směsi, aby byla dostatečně stálá. Je potřeba pečlivě dodržovat dobu a intenzitu míchání připravované suspenze i okamžik odečtu hodnoty na přístroji, nebo málo stalou suspenzi stabilizovat. K tomu účelu se používají ochranné koloidy.

Turbidimetrii lze aplikovat pro kapalné i plynné vzorky. Metoda je vhodná pro měření znečištění vzduchu, jiných plynů či kapalin rozptýlenými částicemi (kouř, aerosoly, stanovení proteinů v séru apod.). V praxi se při vyhodnocování pracuje metodou kalibrační křivky [46, 47].

2.4.3. Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda. Vzorek se vnáší mezi dvě fáze. Jedna je pohyblivá (mobilní fáze) a pohybuje se přes druhou, která je nepohyblivá (stacionární). Separace je založena na rozdílné afinitě složek směsi k mobilní a k stacionární fázi. Stacionární fáze může mít v různých typech chromatografií velmi rozdílnou formu (např. částčky tuhé fáze, tenká vrstva kapaliny na pevných částicích, film kapaliny na vnitřní straně kapiláry).

Prostřednictvím chromatografických technik je možno získat kvalitativní i kvantitativní informace, tzn. kromě určení složení směsi lze stanovit i koncentraci jednotlivých složek. Pro úplnou identifikaci je však nezbytné propojení s dalšími metodami analytické chemie např. hmotnostní spektrometrií, UV-VIS spektrometrií apod. [47, 48].

Během chromatografického dělení dochází k opakovanému transportu složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Přitom se chromatografický systém natolik přiblíží rovnováze, že rozdělení složky mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční neboli rozdělovačí konstantou. Tato konstanta vyjadřuje tedy poměr rovnovážných koncentrací této složky v obou fázích [48].

Chromatografické metody se dělí podle několika hledisek. Mezi základní patří dělení podle povahy mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze a podle povahy děje, který převládá při separaci [47].

Podle skupenství mobilní fáze se dělí chromatografie na plynovou (gas chromatography, GS) a kapalinovou (liquid chromatography, LC). Zatímco plynová chromatografie pracuje v systému plyn-pevná látka nebo častěji plyn-kapalina, kapalinová chromatografie pak v systému kapalina-kapalina nebo pevná látka-kapalina. Dalším kritériem je pak separační mechanismus, tj. charakter interakce dělené látky se stacionární fází. Podle tohoto principu rozlišujeme chromatografii adsorpční, rozdělovačí, ionexovou a afinitní [48]. Dle uspořádání stacionární fáze se dělí chromatografie na chromatografii kolonovou, kde stacionární fáze je umístěna v koloně (column chromatography, CC), a chromatografii v plošném uspořádání. Mezi ploště uspořádané chromatografie patří papírová, kde stacionární fáze je součástí chromatografického papíru (paper chromatography, PP), a tenkovrstvá se stacionární fází umístěnou na plochém podkladu, např. hliníková folie, skleněná deska (thin layer chromatography, TLC) [47].

2.4.3.1. *Chromatografie na tenké vrstvě*

Chromatografie na tenké vrstvě se nejčastěji provádí jako kvalitativní analýza. Stacionární fází je obvykle hliníková destička pokrytá silikagelem a škrobem (silufol). Mobilní fází jsou organická rozpouštědla [47].

Na desku se nanese vzorek (obvykle spolu se standardy) a destička se vloží do vyvíjecí komory, v které je rozpouštědlo, které přetéká přes stacionární fází. Jakmile se mobilní fáze při průtoku papírem či tenkou vrstvou dostane ke startu, část vzorku se rozpustí v mobilní fází. Ustaví se rovnováha mezi rozpustností složky v stacionární fází a rozpustností složky v mobilní fází. Vlivem různě velkých distribučních konstant pro různé složky vzorku dojde k jejich různé migraci na nosiči a tudíž k rozdělení na zóny obsahující jednotlivé složky. Látky více rozpustné ve stacionární fází se budou pohybovat pomaleji, naopak látky s vyšší rozpustností v mobilní fází budou blíže čelu rozpouštědla. Budou-li mít látky v daném systému stejnou distribuční konstantu, nerozdělí se a je třeba hledat vhodnější kombinaci mobilní a stacionární fáze. V okamžiku, kdy čelo mobilní fáze vystoupá na okraj desky, deska se vyjme, vysuší a pokud nejsou složky tvořeny barevnými látkami, provede se jejich detekce. Nejčastěji se k tomu používá specifická barevná reakce [48].

Po detekci rozdělených látek se chromatografie vyhodnocuje pomocí veličiny R_F ; což je poměr vzdálenosti středu skvrny D_S a vzdálenosti čela $D_Č$ rozpouštědla od startu.

$$R_F = (D_S / D_Č) \quad (4)$$

Největší vliv na hodnotu R_F cukrů má velikost molekuly, neboli počet monosacharidových jednotek) a počet uhlíků v molekule. Podstatně se uplatňuje také prostorové uspořádání hydroxylů, jejich počet a charakter kruhu. Cukry jsou velmi málo rozpustné v organických rozpouštědlech. Je-li pohyblivou fází organické rozpouštědlo, hodnoty R_F jsou vesměs malé.

Jednou z výhod planárních technik je možnost provádět více analýz současně a to na jedné tenké vrstvě [47, 48].

2.4.4. Princip metody Somogyi – Nelsona

Oxidoredukční reakce jsou založeny na redukujícím účinku volné karbonylové skupiny. Aldehydová skupina aldosa se přitom oxiduje na karboxyl, u ketos dochází k oxidaci spojené s štěpením řetězce. Oligosacharidy, které nemají volnou karbonylovou skupinu (volný poloacetalový hydroxyl) reakci neposkytují [48]

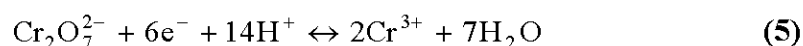
Redukující sacharidy v alkalickém prostředí a za zvýšené teploty (100 °C) redukují měďnatou sůl obsaženou v somogyiho činidle. Tato sůl pak vytváří s Nelsonovým činidlem modrozelený komplex, jehož koncentrace se měří spektroskopicky při 540 nm proti blanku [48]

2.4.5. Princip stanovení CHSK

K posouzení obsahu organických látek se používá metoda stanovení tzv. spotřeby kyslíku. Existují dva ukazatele znečištění, a to biologická spotřeba kyslíku (BSK), která vyjadřuje spotřebu kyslíku za určité časové období na biochemickou oxidaci biologicky rozložitelných látek mikroorganismy, a chemická spotřeba kyslíku (CHSK), která postihuje organické látky biologicky rozložitelné i nerozložitelné.

CHSK neboli chemickou spotřebu kyslíku, lze definovat jako hmotnostní koncentraci kyslíku, která je ekvivalentní hmotnosti silného oxidačního činidla spotřebovaného za vymezených podmínek na oxidaci oxidovatelných látek obsažených v 1 l vody. Přičemž hlavní skupinu „oxidovatelných“ látek tvoří látky organické, které obsahují vodu v různé koncentraci dle svého znečištění [38].

Metoda stanovení CHSK je založena na oxidaci organických látek obsažených ve vzorku (médium bez mikroorganismů) dichromanem draselným v silně kyselém prostředí kyseliny sírové při dvouhodinovém varu (při teplotě 148 °C ± 3 °C). Oxidace organických látek je katalyzována ionty Ag^+ a probíhá v nadbytku dichromanu. Pro maskování chloridů, jež by způsobovaly při stanovení CHSK_{Cr} pozitivní chybu, se přidává síran rtuťnatý. Při oxidaci se dichromanové ionty zredukovávají na ionty chromité podle reakce:



Koncentrace chromitého iontu, která je úměrná obsahu organických látek ve vzorku, se stanoví metodou absorpční spektrofotometrie při vlnové délce $\lambda = 600 \text{ nm}$. Množství CHSK se pak určí z kalibrace [38].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1. Chemikálie

3.1.1.1. Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

K revitalizaci inokula bylo využito syntetické medium glukosové nebo laktosové. Pro kultivaci polyuretanových materiálů ve fermentoru a na třepačce bylo připraveno glukosové medium. Složení medií tab. 7 a tab. 8.

Tab. 7: Složení glukosového media

LÁTKA	c [g.l ⁻¹]
D-Glukosa	4,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O p.a.	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ p.a.	0,4
KH ₂ PO ₄ p.a.	6,0
Kvasničný extrakt	2,0
Pepton	6,0

Tab. 8: Složení laktosového media

LÁTKA	c [g.l ⁻¹]
Laktosa	4,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O p.a.	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ p.a.	0,4
KH ₂ PO ₄ p.a.	6,0
Kvasničný extrakt	2,0
Pepton	6,0

3.1.1.2. Chemikálie pro stanovení CHSK

Oxidační roztok:

Oxidační roztok byl připraven rozpuštěním 10,2148 g dichromanu didraselného (předem vysušeného při 110 °C 2 hod.) v 500 ml destilované vody. Za stálého míchání bylo přidáno 167 ml koncentrované kyseliny sírové a 33,33 g síranu rtuťnatého.

Katalyzátorový roztok:

Katalyzátorový roztok byl připraven rozpuštěním 10 g síranu stříbrného v 1 l koncentrované kyseliny sírové.

Standardní roztok hydrogenftalatu draselného (HFK):

V 1000 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,851g HFK a doplněno po rysku destilovanou vodou. CHSK takto připraveného roztoku bylo 1000 mg.l⁻¹.

3.1.1.3. *Chemikálie pro stanovení redukujících cukrů*

Somogyi – Nelsonovo činidlo I. :

Činidlo I. bylo připraveno rozpuštěním 24 g uhličitanu sodného, 16 g hydrogenuhličitanu sodného, 144 g síranu sodného a 12 g vlnanu sodno-draselného v 800 ml destilované vody.

Somogyi – Nelsonovo činidlo II. :

Činidlo II. bylo připraveno rozpuštěním 4 g pentahydrátu síranu měďnatého a 24 g síranu sodného ve 200 ml destilované vody.

Somogyi – Nelsonovo činidlo III. :

Činidlo III. bylo připraveno rozpuštěním 25 g molybdenanu amonného ve 450 ml destilované vody, poté bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové a 3 g heptahydrátu.

Standardní roztok laktosy:

Pro přípravu standardního roztoku laktosy (o koncentraci 1 g.l⁻¹) bylo v 1000 ml odměrné baňce rozpuštěno 1g laktosy a doplněno po rysku destilovanou vodou.

Standardní roztok glukosy:

1g glukosy byl rozpuštěn ve 1000 ml destilované vody. Takto byl připraven standardní roztok o koncentraci 1 g.l⁻¹.

3.1.1.4. *Chemikálie pro TLC chromatografii*

Vyvíjecí směs

Bylo připraveno smícháním butanolu, kyseliny octové a vody v poměru 4:1:5.

Detekční činidlo

Bylo připraveno smícháním difenylaminu, anilinu, acetonu a kyseliny fosforečné.

3.1.2. **Přístroje**

- Spektrofotometr Unicam typ Helios Epsilon
- Centrifuga VEB MLW ZENTRIFUGENBAU K23
- Dvojvaříč Eta 311901
- Mrazicí box Ecolab HFL 230
- Pec Mora 524
- Analytické váhy
- Termostatovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)
- Termostatovaná třepačka, Heidolph Promax 1020, Labicom s.r.o. (ČR)
- PH metr, Hanna instrumentals
- Fermentor BIOSSTAT B, B.Braun Biotech
- Turbidimetr Eutech Instruments Turbidimetr NT-100
- Fotoaparát GKB 1/3“ color digital
- Mikroskop LII 00A, Intraco Micro
- Běžné laboratorní sklo

3.1.2.1. Fermentor

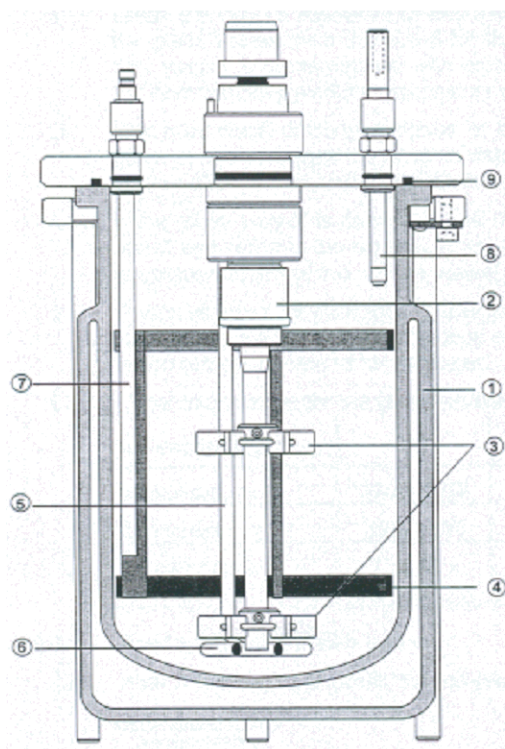
Ke kultivacím byl používán laboratorní bioreaktor Biostat B od firmy B. Braun Biotech (viz obr. 5) s pracovním objemem 2 litry. Řídící a měřicí jednotka, připojená k fermentoru, přenáší data do počítače prostřednictvím programu Comman. Program zaznamenává tyto veličiny: čas, teplotu, pH, koncentraci rozpuštěného kyslíku a přídavky kyseliny a báze upravující pH. Zpracovaná data se zároveň ukládají do programu Excel.

Fermentor je vybaven:

- termostatickým systémem pro regulaci teploty v rozmezí 8 – 65 °C
- regulací a měřením pH pomocí skleněné elektrody
- měřením koncentrace rozpuštěného kyslíku pomocí kyslíkové elektrody
- průtokoměrem pro regulaci vzdušnění, max. 10 l.min⁻¹
- regulátorem otáček pomocí 6-ti lopatkového turbínového míchadla v rozmezí 50 – 1 200 otáček za minutu

Průtočný chladič a termostat slouží k udržování konstantní teploty. Mikrofiltry jsou nutné pro zabezpečení přívodu i odvodu vzduchu, aby nedocházelo ke kontaminaci z okolního vzduchu a úniku mikroorganismů. Při zanesení filtru je možné mírné zvýšení tlaku v reaktoru.

Úprava pH se provádí pomocí kyseliny sírové a hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l⁻¹. Tyto roztoky jsou dávkovány pomocí peristaltických čerpadel připojených k regulační jednotce. Proti tvorbě pěny, vznikající při kultivaci termofilních organismů se používá odpěňovací činidlo.



Vysvětlivky k obrázku:

- 1...skleněný dvojité plášť reaktoru
- 2...hřídel mechanického míchadla
- 3...lopatky násobného míchadla
- 4...míchací nárazky
- 5...trubice přívodu vzduchu
- 6...aerační věnec
- 7...odběrová trubice
- 8...snímač pění
- 9...těsnění víka

Obr. 5: Schéma fermentoru [50]

Všechny kultivace probíhaly za aerace vzduchem při nastavené teplotě 60 °C, pH 6,5, a míchání 150 rpm. Jedná se o způsob jednostupňový, probublávaný, s nucenou cirkulací kapalin [51].

3.1.3. Materiál

3.1.3.1. Použité kmeny bakterií a příprava kultivace

K testování biodegradability modifikovaných PUR pěn, folií a syrovátky byla použita aerobní bakteriální směsná termofilní kultura rodů *Bacillus* a *Thermus*, která je používána k aerobnímu čištění odpadních vod v čistírně odpadních vod v Bystřici pod Hostýnem [32].

Odstředěná a promytá biomasa byla uchovávána v hlubokochladicím boxu při $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve zkumavkách s kryoprotektikem glycerolem. Poměr biomasy a glycerolu byl 5:2. Pro přípravu inokula byla použita buď přímo zamražená kultura, nebo kultura již rekultivovaná na třepačce (při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 110 – 120 rpm, 2 – 3 dny) na glukosovém mediu pro kultivaci s PUR pěnou/folií, nebo na laktosovém mediu pro kultivaci na syrovátce (složení medií viz 3.1.1.1).

3.1.3.2. Testované PUR pěny

V této práci byly testovány tři druhy modifikovaných polyuretanových pěn a tři druhy modifikovaných polyuretanových folií. Veškeré vzorky byly poskytnuty pracovníky Ústavu chemie materiálů FCH VUT v Brně. Pro přípravu pěn byl použit polyeterový polyol, tolynediisocyanát 80/20 (TDI), cínový a aminový katalyzátor.

Jako modifikační činidla byly použity následující polymery: acetylovaný škrob (AS), acetylcelulóza (CA), karboxymethylcelulóza (CMC). Koncentrace modifikačních činidel v pěnách se pohybovala kolem 10 %.

Polyuretanové folie byly připraveny obdobným způsobem bez použití pěnidla (vody).

Tab. 9: Modifikační činidla pěn a folií

Vzorek	Plnivo	Struktura
10% CA	Acetylovaná celulóza	Cel-OCOCH ₃
10% CMC	Karboxymetyl celulóza	Cel-O-CH ₂ -COO ⁻ Na ⁺
10% AS	Acetylovaný bramborový škrob	Škrob – OCOCH ₃

3.1.3.2.1. Příprava PUR pěny a folie pro fermentor

Pěny byly nastříhány na přibližně stejně velké kusy, každý o hmotnosti 0,2 g. Celková hmotnost byla 3 g PUR pěny zvážené s přesností na čtyři desetinná místa na analytických vahách.

Folie byly nastříhány na přibližně stejně velké kusy, každý o hmotnosti 1 g. Celková hmotnost byla 3 g zvážené s přesností na čtyři desetinná místa na analytických vahách.

3.1.3.2.2. Příprava PUR pěny a folie pro kultivaci na třepačce

Pěny byly nastříhány na přibližně stejně velké kusy, každý o hmotnosti 0,05 g. Celková hmotnost byla 0,25 g PUR pěny zvážené s přesností na čtyři desetinná místa na analytických vahách.

Každá folie byla nastříhána na plátek o hmotnosti přibližně 0,25 g a zvážena s přesností na čtyři desetinná místa na analytických vahách.

3.1.3.3. Testovaná syrovátka

Tekutou syrovátku dodala firma Pribina, spol s.r.o. Syrovátka byla zde odpadem z výroby sýrů typu Hermelín [15].

3.1.3.3.1. Příprava syrovátkového kultivačního media

Syrovátka byla před kultivací zbavena bílkovin. Úpravou pH na 4,6 0,1 mol.l⁻¹ kyselinou syrovou byl odstraněn kasein a následným povařením 20 min na vodní lázni byl vysrážen α -laktoglobulin a β -laktoglobulin. Poté následovalo odstředění 10 min při 5000 ot.min⁻¹.

3.2. Kultivace

3.2.1. Kultivace na třepačce - syrovátka

Z odstředěné syrovátky bylo připraveno, úpravou pH (0,1 mol.l⁻¹ NaOH nebo 0,1 mol.l⁻¹ H₂SO₄), po 150 ml syrovátkového media o pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7 a zaočkováno 1 ml rozmraženého inokula. Kultivace probíhala na termostatované třepačce při 60 °C a 110 rpm. Vzorek o objemu 5 ml byl odebírán přibližně každých 24 h po dobu 9 dní. U vzorků byla stanovena biomasa, CHSK a změřeno pH.

3.2.2. Kultivace ve fermentoru – syrovátka

Do fermentoru bylo připraveno 1,5 l odstředěné syrovátky a zaočkováno 150 ml rekultivovaného inokula. Aerobní kultivace probíhala při teplotě 60 °C, při otáčkách 150 rpm a pH 6,5. Vzorky o objemu 20 ml byly odebírány po dvou hodinách s nucenou noční pauzou po dobu přibližně 5 dní. Ze vzorků byla stanovena biomasa, CHSK a obsah redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona. Metodou TLC chromatografie byla stanovována přítomnost laktosy, glukosy a galaktosy ve vzorcích nedegradované předupravené syrovátky, syrovátky po dvou hodinách biodegradace ve fermentoru a vzorku syrovátky po skončení degradace.

3.2.3. Kultivace na třepačce – PUR pěny a folie

Do Erlenmayerových baněk bylo připraveno 100 ml glukosového media (složení viz. tab. 1), každá obsahovala jednu ze tří druhů předem zvážených modifikovaných polyuretanových pěn a tři polyuretanových folií, dvě neobsahovaly PUR pěnu ani PUR folii. Medium bylo zaočkováno 10 ml rekultivovaného inokula. Kultivace byla provedena na termostatované třepačce při 60 °C a 75 – 80 rpm. Vzorky o objemu 5 ml byly odebírány ráno a večer po dobu 5 dní. Ze vzorků byla stanovena biomasa, CHSK a obsah redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona. Po skončení testu byly pěny a folie dokonale promyty v destilované vodě a etanolu a vysušeny do konstantní hmotnosti při 40 °C, poté zváženy a byl určen celkový hmotnostní úbytek. Byla také provedena mikroskopická analýza degradovaných a nedegradovaných PUR pěn a folií.

Zároveň byly provedeny slepé pokusy pouze s PUR foliemi. Folie byly třepány za stejných podmínek a stejnou dobu bez kultury, nárůstu kontaminace bránil azid sodný (NaN_3). Po skončení testu byly folie dokonale promyty v destilované vodě a etanolu a vysušeny do konstantní hmotnosti při 40 °C. Poté byly folie zváženy a byl určen abiotický hmotnostní úbytek.

3.2.4. Kultivace ve fermentoru – PUR pěn/ folie

Do fermentoru bylo připraveno 1,5 l glukosového media (složení viz. tab. 7) s příslušným předem zváženým vzorkem PUR pěny či folie a zaočkováno 150 ml rekultivovaného inokula. Aerobní kultivace probíhala při teplotě 60 °C, při otáčkách 150 rpm a pH 6,5. Vzorky o objemu 10 ml byly odebrány dvakrát denně po dobu 5 dní.

Jako srovnávací měření byla použita kultivace na glukosovém mediu. Kultivace probíhala za stejných podmínek. Vzorky o objemu 10 ml byly odebrány po dvou hodinách s nucenou noční pauzou po dobu přibližně 5 dní.

Ze vzorků byla stanovena biomasa, CHSK a obsah redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona. Po skončení testu byly pěny a folie dokonale promyty v destilované vodě a etanolu a vysušeny do konstantní hmotnosti při 40 °C, poté zváženy a byl určen celkový hmotnostní úbytek. Byla také provedena mikroskopická analýza degradovaných a nedegradovaných PUR pěn a folií.

3.3. Analytické metody

Odebrané množství vzorku z fermentoru nebo Erlenmyerovy baňky bylo zcentrifugováno při 2500 ot.min⁻¹, 15 minut. Takto byl získán supernatant, který dále sloužil k stanovení redukujících cukru a CHSK, a sediment, použitý ke stanovení biomasy. Biomasa se také stanovovala turbidimetricky.

3.3.1. Analýza sedimentu

3.3.1.1. Gravimetrické stanovení biomasy

Pro stanovení sušiny byl sediment promyt destilovanou vodou a opět stočen. Poté byly buňky kvantitativně převedeny do předem vysušených a zvážených váženek. Váženky s biomasou byly sušeny do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C, ochlazeny na laboratorní teplotu v exsikátoru a zváženy na analytických vahách. Z rozdílu hmotnosti prázdné váženky a váženky se sušinou byla stanovena koncentrace biomasy.

3.3.1.2. Stanovení biomasy turbidimetricky

Pro stanovení biomasy byla u kultivací modifikovaných polyuretanů v Erlenmayerových baňkách použita metoda turbidimetrická. Vzorky s těchto kultivací byly odebrány do kyvet a proměřeny v předem nakalibrovaném turbidimetru. Výsledná turbidance v jednotkách NTU byla přepočítána na koncentraci sušiny biomasy pomocí kalibrační křivky. Ta byla vytvořena vážkovým stanovením sušiny biomasy a jeho srovnáním s turbidimetrickým stanovením zákalu.

3.3.2. Analýza supernatanu

3.3.2.1. Stanovení CHSK (chemické spotřeby kyslíku)

Z naředěného vzorku supernatanu bylo odpipetováno 2,5 ml do uzavíratelné zkumavky. Z dávkovací láhve bylo přidáno 1,5 ml oxidačního roztoku a 3,5 ml katalyzátorového roztoku. Zkumavky byly uzavřeny, obsah promíchán a zahříván po dobu 2 hodin při teplotě 150 °C. Po dokonalém vychladnutí byl obsah zkumavek zředěn 5 ml destilované vody. Po promíchání byla stanovena absorbance vzorku při vlnové délce $\lambda = 600$ nm.

Kalibrace CHSK_{Cr} byla provedena ředěním standardního roztoku hydrogenftalanu draselného na kalibrační roztoky 100 mg.l^{-1} - 1000 mg.l^{-1} . Poté byla změřena absorbance těchto roztoků a z hodnot sestrojena kalibrační křivka.

3.3.2.2. Stanovení redukujících cukru metodou Somogyi – Nelsona

Do zkumavek bylo odpipetováno 0,5 ml Somogyiho činidla (I. + II. V poměru 4:1) a přidáno 0,5 ml naředěného supernatanu. Poté byly Zkumavky 10 min povařeny ve vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku (činidlo III.) a 3,5 ml destilované vody. Po promíchání byla proměřena absorbance na spektrofotometru při 530 nm.

Kalibrace byla provedena ředěním standardního roztoku laktosy nebo glukosy o koncentraci 1 g.l^{-1} na kalibrační roztoky. Poté byla změřena absorbance těchto roztoků a z hodnot sestrojena kalibrační křivka.

3.3.2.3. Kvalitativní analýza sacharidů v syrovátce

Toto stanovení bylo provedeno s využitím TLC chromatografie. Touto metodou byly stanoveny sacharidy obsažené v dodané syrovátce a sacharidy, které se vyskytovaly ve vzorku po dvou hodinách a po ukončení degradace ve fermentoru.

Na desce sulfitolu byl označen start asi 1 cm od okraje, na něj byly kapilárou nanесeny tři kapky z každého vzorku a standardu laktosy, glukosy a galaktosy. Po nanесení byl chromatogram vysušen při 60 °C a poté umístěn do chromatografické komory s vyvíjecí směsí. Po ukončení chromatografie byl chromatograf vyjmut a bylo označeno čelo rozpouštědla. Suchý chromatogram byl postříkán detekčním činidlem a znovu usušen.

3.3.3. Mikroskopie PUR pěn a folií

Polyuretanové pěny a folie byly pozorovány a vyfotografovány před a po degradaci použitím mikroskopu LII 00A od firmy Intraco Micro a fotoaparátu k mikroskopu GKB 1/3“ color digital CCD kamera. Fotografie byly dále zpracovány na počítači, v programu Lucia.

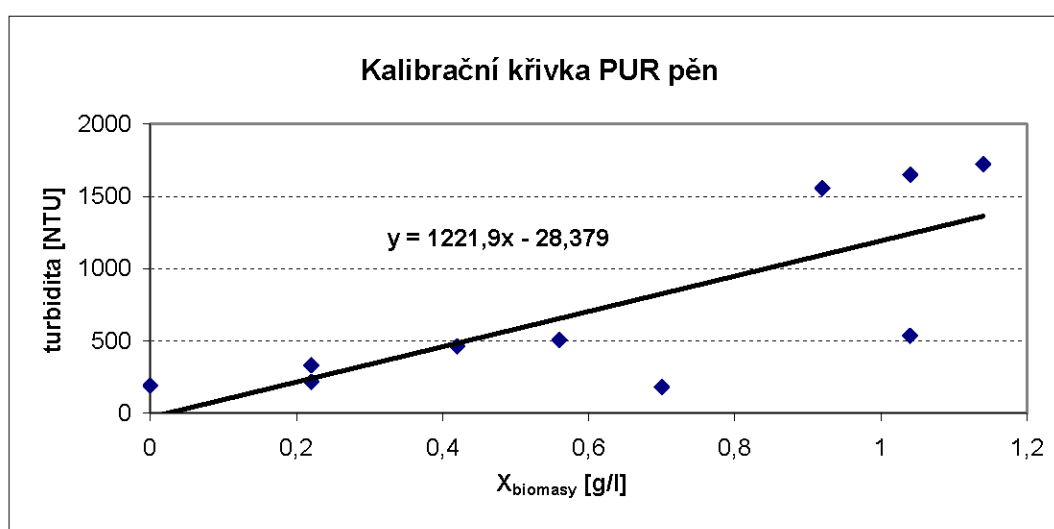
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Tabulky veškerých měření jsou uvedeny v příloze.

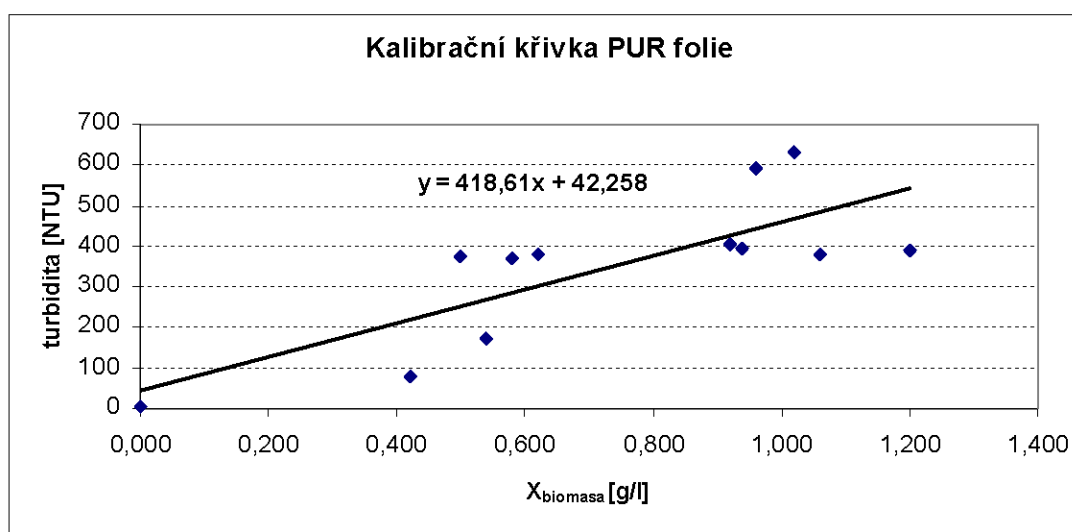
4.1. Kalibrace

4.1.1. Kalibrace turbidimetrického stanovení biomasy

Byla sestrojena kalibrační závislost turbidity na koncentraci biomasy z hodnot turbidimetrického měření zákalu suspenze buněk a gravimetrického stanovení hmotnosti biomasy ze vzorků odebraných během kultivace. Kalibrace byla sestrojena jak pro PUR pěny (graf 1) tak pro PUR folie (graf 2). Turbidimetrická metoda byla použita pouze na kultivace PUR pěn a folií na třepačce. Tato metoda nebyla vhodná pro stanovení biomasy ve fermentoru, vzhledem k velkému nárůstu biomasy a následnému ředění pro turbidimetrické měření.



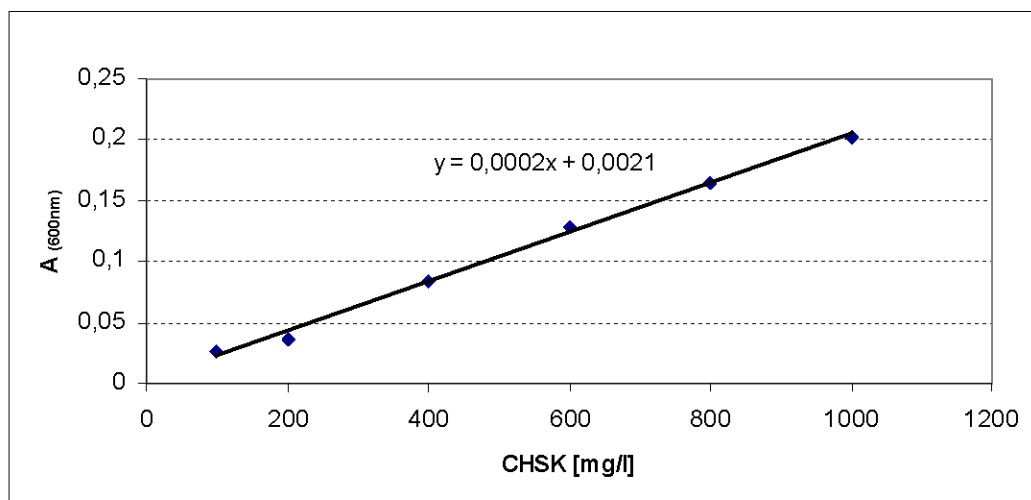
Graf 1: Kalibrační křivka PUR pěn



Graf 2: Kalibrační křivka PUR folií

4.1.2. Kalibrace CHSK

Z hodnot získaných proměřením kalibračních roztoků, připravených naředěním standardního roztoku hydrogenftalatu draselného, byla sestrojena kalibrační křivka (graf 3). Pomocí této křivky byly přepočtem zjištěny z hodnot absorbancí koncentrace CHSK v mg.l^{-1} vzorků. Kalibrace byla použita jak pro kultivace s přidavkem PUR pěn a folií, tak i při kultivaci termofilní kultury na syrovátce.



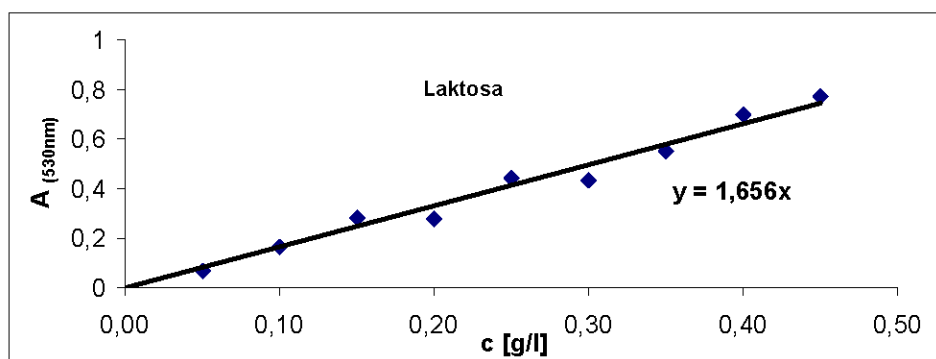
Graf 3: Kalibrační křivka CHSK

4.1.3. Kalibrace redukujících cukrů

Proměřením kalibračních roztoků, připravených naředěním standardních roztoků laktosy a glukosy, byly sestrojeny kalibrační křivky. Pomocí těchto křivek byly přepočtem zjištěny z hodnot absorbancí koncentrace redukující cukrů v g.l^{-1} u vzorků.

4.1.1.1. Laktosa

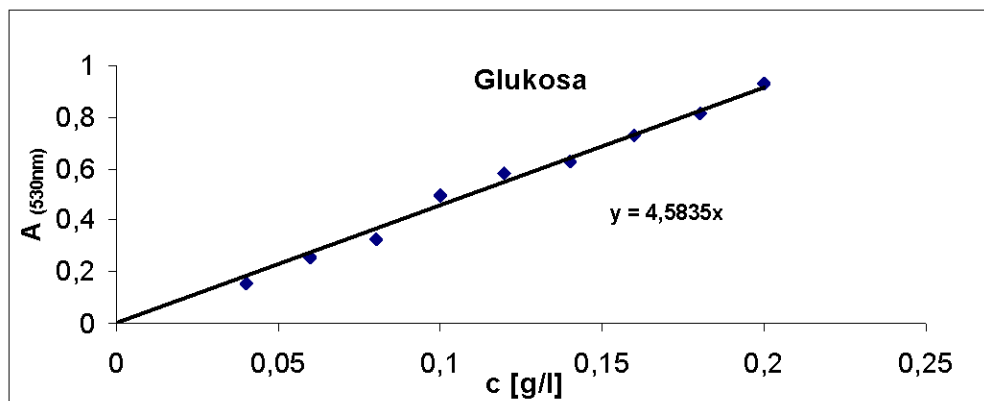
Laktosová kalibrační křivka byla použita při určování koncentrace redukujících cukrů v syrovátce při kultivaci ve fermentoru (graf 4).



Graf 4 : Kalibrace redukujících cukrů – laktosa

4.1.1.2. Glukosa

Glukosová kalibrační křivka byla použita při určování koncentrace redukujících cukrů při kultivaci termofilní kultury v přítomnosti PUR pěn a folií na třepačce i ve fermentoru (graf 5).



Graf 5: Kalibrace redukujících cukrů – glukosa

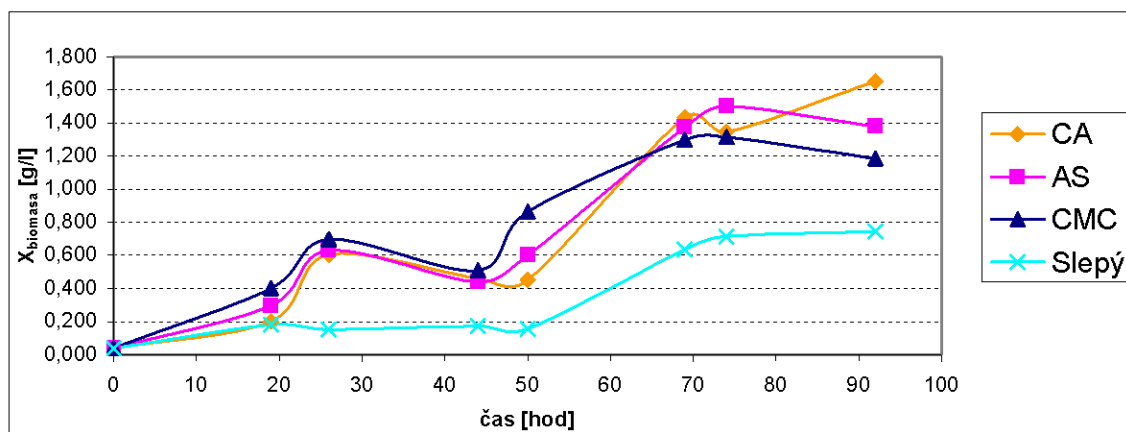
4.2. Výsledky biodegradace PUR pěn a folií

4.2.1. Kultivace na třepačce

V průběhu testu byl sledován růst biomasy, vývoj CHSK a redukujících cukrů. Po ukončení kultivace byla provedena mikroskopická analýza, srovnání degradovaných PUR pěn a folií s nedegradovanými.

4.2.1.1. Turbidimetrické stanovení biomasy

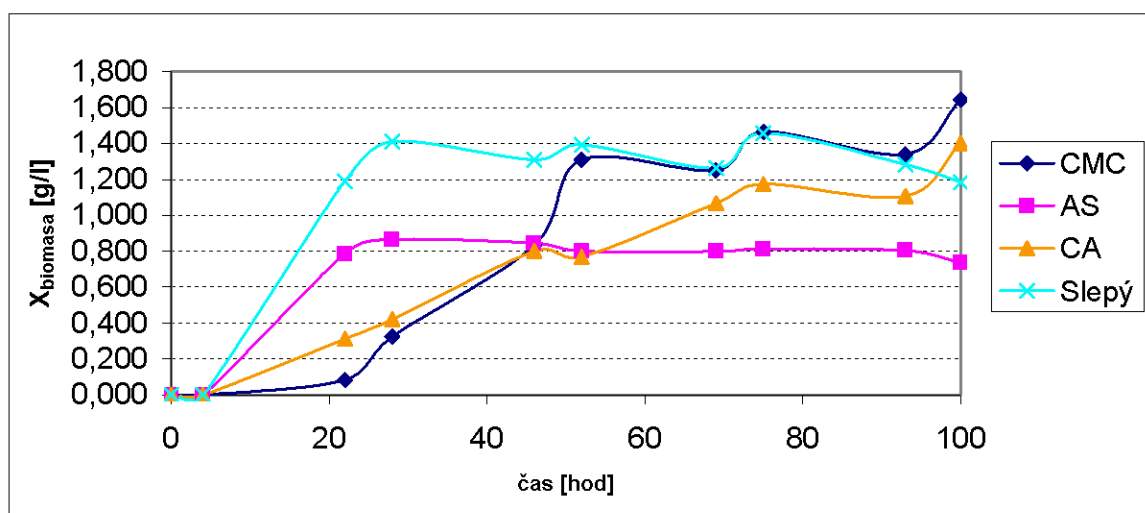
V průběhu stanovení růstové křivky směsné termofilní kultury byl sledován přírůstek biomasy turbidimetrickým stanovením zákalu. Průběh růstové křivky byl sledován jak u kultivací s přidavkem PUR pěn (graf 6) tak i u PUR folií (graf 7). Hodnoty zákalu byly přepočteny na množství biomasy v g.l⁻¹ pomocí vztahů získaných s použitím sestrojené kalibrace (graf 1, 2).



Graf 6: Turbidimetrické stanovení biomasy PUR pěn – kultivace na třepačce

Růstové křivky kultur kultivovaných s PUR pěnou jsou si velice podobné (graf. 6). Docházelo k postupnému nárůstu biomasy. Všechny kultury s přidavkem PUR pěny přerostly kulturu bez pěny. Pěny tedy podporovaly růst biomasy. Tyto výsledky odpovídají výsledkům získaných v jiné diplomové práci [32].

Mezi 16. a 23. hodinou nejspíše dochází k první exponenciální fázi růstu biomasy. Další prudký nárůst v 44. hodině může být způsoben využíváním jiného substrátu pro růst. Průběh růstových křivek, lze označit jako diauxický.



Graf 7: Turbidimetrické stanovení biomasy PUR folií – kultivace na třepačce

Srovnáním růstových křivek kultur s přidavkem PUR folií je patrné, že nejrychlejší nárůst biomasy byl zaznamenán u slepé kultivace bez folie (graf 7).

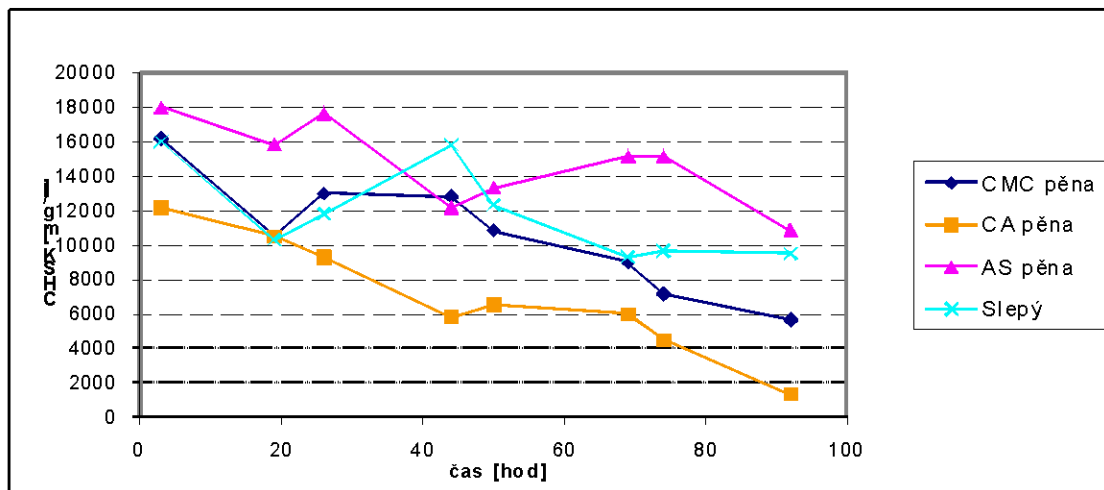
U kultivace v přítomnosti AS folie a kultivace bez folie je zřejmá lag – fáze do 4. hodiny kultivace a exponenciální nárůst biomasy do 28. hodiny. Do konce kultivace nedochází k výraznějšímu nárůstu kultury. V přítomnosti CMC a CA folie dochází během celé kultivace k pozvolnějšímu nárůstu biomasy. U těchto dvou kultivací nelze jednoznačně rozlišit jednotlivé fáze růstu.

Při srovnání růstových křivek kultivací v přítomnosti PUR pěn (graf 6) a PUR folií (graf 7), lze vidět, že pěny podléhají degradaci lépe nežli folie. V porovnání se slepou kultivací u pěn došlo k výraznějšímu nárůstu biomasy. Srovnáním slepé kultivace s kultivací v přítomnosti folií spíše přítomnost folií působí na růst inhibičně. Inhibiční účinek může být způsoben uvolňováním toxických látek z folií do media. U pěn se tyto látky mohou uvolňovat v průběhu napěňování, a proto negativně neovlivňují růst kultury.

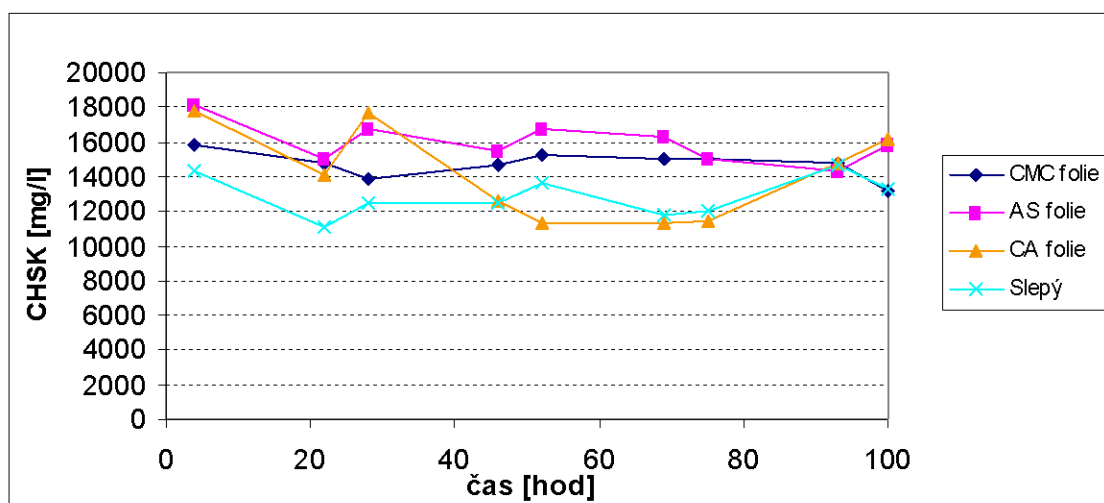
Z hlediska průběhu růstové křivky AS, CA a CMC pěny jsou si velice podobné, ani mezi CA a CMC folií není velký rozdíl. Největší inhibiční účinek na růst termofilní kultury má AS folie.

4.2.1.2. Stanovení CHSK

Stanovení chemické spotřeby kyslíku bylo provedeno pro kultivace na třepačce pro slepé – referenční kultivace a kultivace za stejných podmínek v přítomnosti PUR folií a pěn.



Graf 8: Stanovení CHSK PUR pěn na třepačce



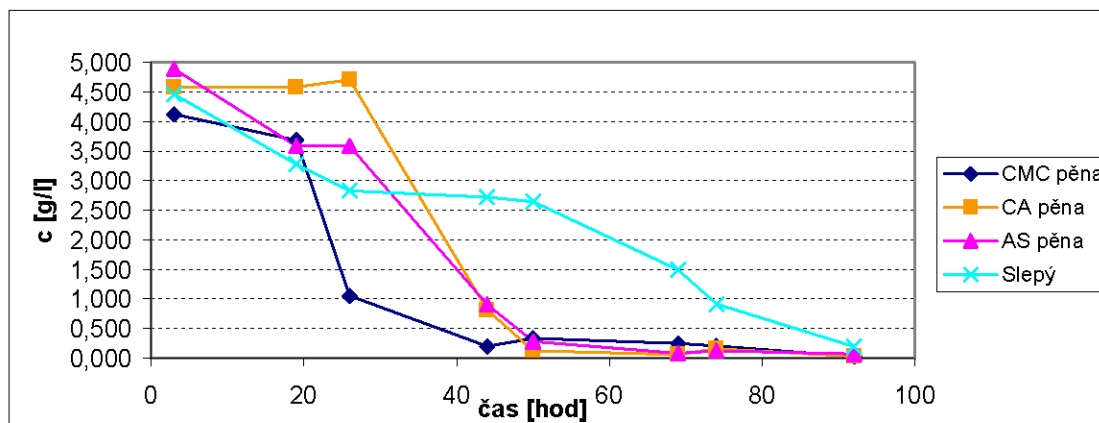
Graf 9: Stanovení CHSK PUR folií na třepačce

U všech kultivací s pěnou byl zaznamenán pokles hodnot CHSK (graf 8). Největší pokles byl zaznamenán u CA pěny a to přibližně 90 %, dále pak u CMC pěny pokles o 65 %. V přítomnosti AS pěny a u slepé kultivace hodnota CHSK klesla o cca 40 %.

U kultivací v přítomnosti folií se CHSK výrazně neměnilo (graf 9). To lze vysvětlit uvolňováním organických látek z folií a inhibičním účinkem na růst termofilní kultury.

4.2.1.3. Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona

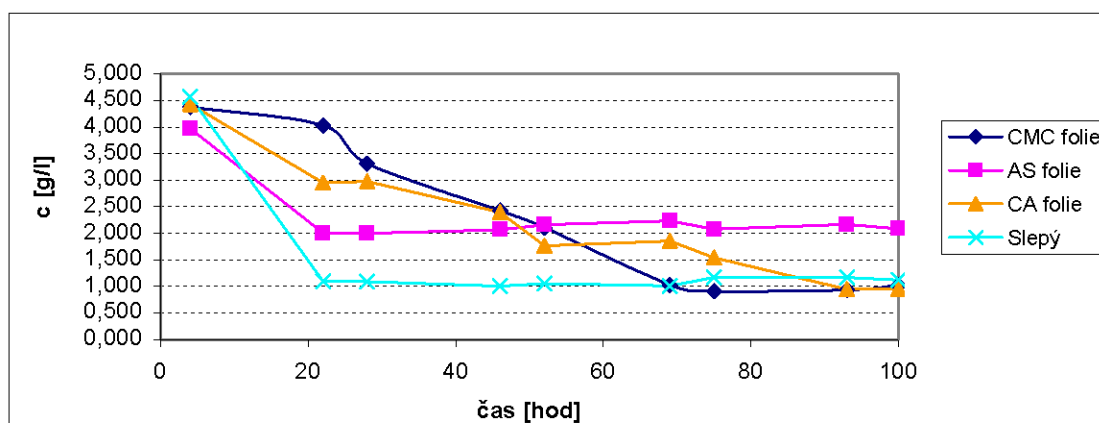
Stanovení redukujících cukrů bylo provedeno pro kultivace na třepačce pro slepé – referenční kultivace a kultivace za stejných podmínek v přítomnosti PUR folií a pěn.



Graf 10: Stanovení redukujících cukrů PUR pěn na třepačce

Při kultivaci v přítomnosti pěn došlo k vyčerpání obsahu redukujícího cukru (glukosy) v prvních 45 až 50 hodinách (graf 10). Další nárůst biomasy (graf 6) může být tedy způsoben využíváním jiného zdroje uhlíku, nejspíše modifikačních činidel, které jsou obsaženy v pěnách.

Pokles obsažené glukosy u slepé kultivace byl postupný, neboť vzrůst biomasy byl vůči pěnám nízký. K vyčerpání zdroje uhlíku došlo kolem 92 hodiny, tedy při ukončování kultivace (graf 10).



Graf 11: Stanovení redukujících cukrů PUR folií na třepačce

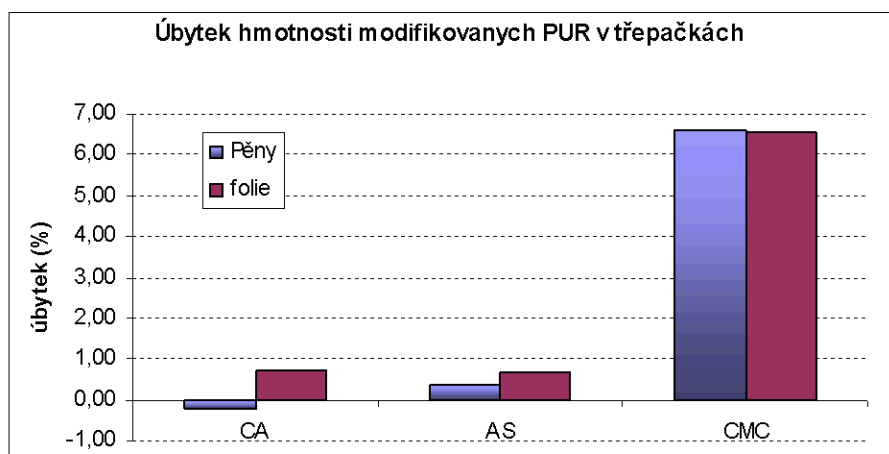
Nárůst biomasy v přítomnosti folií odpovídá snižující se koncentrací glukosy v mediu (graf 11). U kultivace v přítomnosti CMC a CA folií byl postupný a v přítomnosti AS folie a referenční kultivace měl do cca 20. hodiny exponenciální průběh, poté stacionární.

Srovnání růstové křivky a vývoje obsahu glukosy během kultivace napovídá, že PUR folie během kultivace nesloužily jako další zdroj uhlíku pro tuto směsnou termofilní kulturu.

4.2.1.4. Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií

Byly stanoveny hmotnostní úbytky PUR folií, a to jak třepaných v přítomnosti kultury, tak i v médiu bez kultury, ve kterém nárůstu kontaminace bránil azid sodný. Tato kontrolní kultivace byla provedena za účelem posouzení mechanických a teplotních vlivů na celkovou míru degradace jednotlivých typů folií. Z rozdílu kultivace za přítomnosti bakteriální kultury a kultivace bez biologického vlivu byla určena míra biotického faktoru degradace.

Byly také stanoveny celkové úbytky hmotností PUR pěn třepaných v přítomnosti kultury. Abiotické a biotické vlivy na degradaci PUR pěn nebyly zkoumány z důvodu nedostatku potřebného množství pěnového materiálu.



Graf 12: Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií na třepáče v přítomnosti kultury

Tab. 10: Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií na třepáče v přítomnosti kultury

PUR		Celkový úbytek [%]	Úbytek abiotický [%]	Úbytek biotický [%]
Pěny na třepáče	CA	-0,20		
	AS	0,38		
	CMC	6,61		
Folie na třepáče	CA	0,73	0,20	0,53
	AS	0,66	0,32	0,34
	CMC	6,58	5,03	1,55

Největší úbytek hmotnosti byl zaznamenán u polyuretanů s přídavkem CMC plnidla (graf 12). Tento úbytek dosahoval až 7 % během přibližně 100 hodinové degradaci. Mezi pěny a foliemi se stejným modifikačním činidlem v celkovém úbytku hmotnosti nebyl výraznější rozdíl. Přírůstek hmotnosti CA pěny může být způsoben sorbcí bakteriální kultury, kterou se nepodařilo uvedeným způsobem odstranit (viz 3.2.3).

Na hmotnostní úbytek PUR folií má vliv jak biotická tak abiotická degradace. Destruktivní působení termofilních bakterií je u jednotlivých folií stejná, jen u CMC folie je jeho velký hmotnostní úbytek způsoben převážně abiotickými vlivy, které mají vliv i na hodnotu biotické degradace, jelikož dochází k následné bioasimilaci degradačních produktů abiotické degradace.

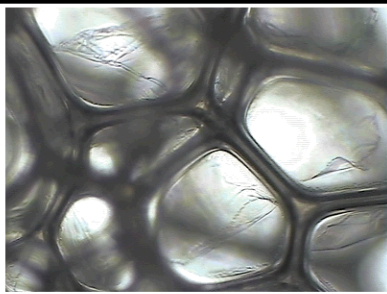
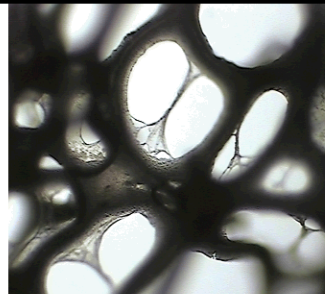
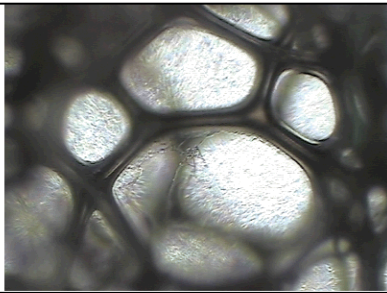
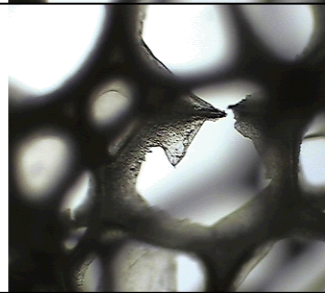
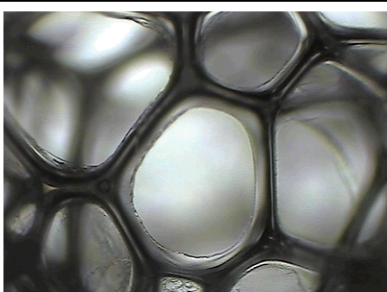
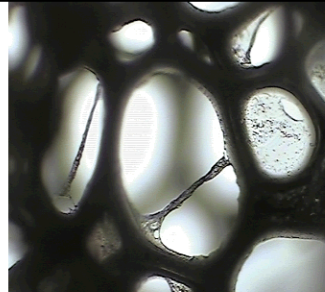
Vliv na hmotnostní úbytek PUR pěn měla především abiotická degradace materiálu, neboli degradace způsobena zejména v důsledku mechanického namáhání během třepání a/nebo rozpouštění plnidla spojeného s vlivem relativně vysoké teploty (60 °C). Termofilní bakterie se na celkovém hmotnostním úbytku pěn výrazně nepodílely /1/.

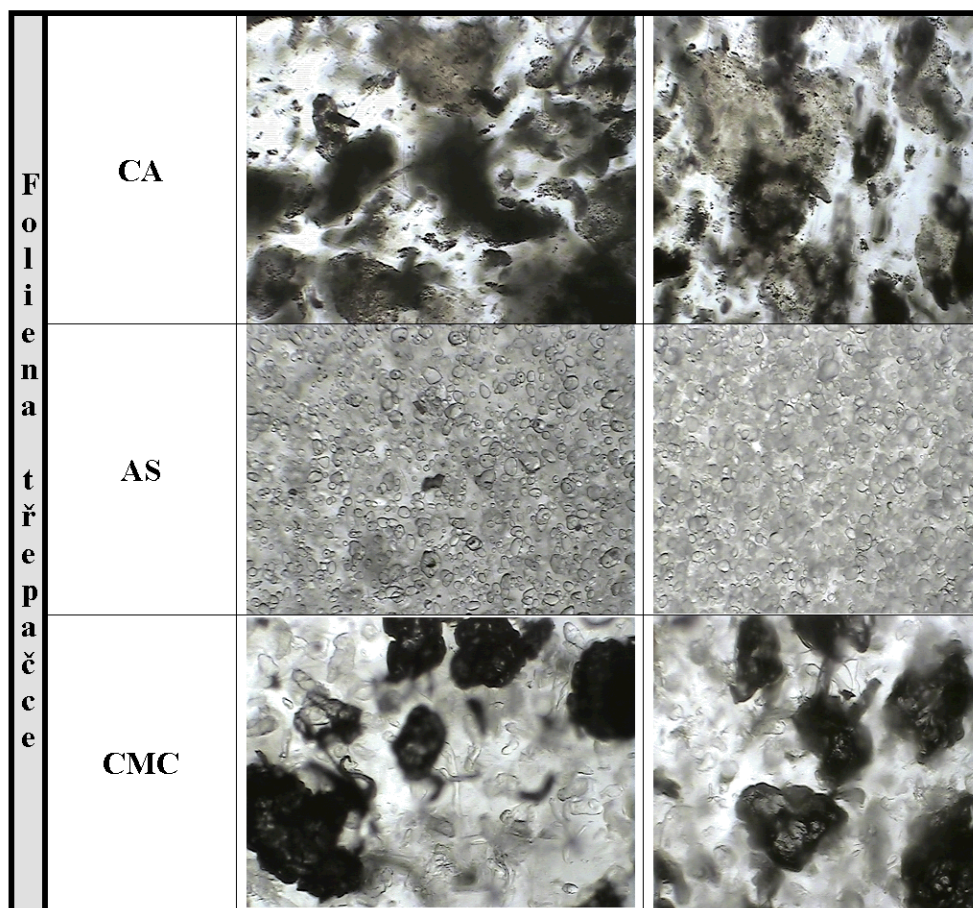
4.2.1.5. Mikroskopické stanovení

Porovnáním mikroskopických obrazů polyuretanových pěn před a po biodegradaci je možno posoudit míru biodegradability testovaných vzorků při kultivaci na třepačce.

Největší poškození lze vidět na mikroskopických snímcích PUR pěn. Na snímcích CA a CMC folie, lze pozorovat zřetelné poškození zrn modifikačního činidla. Vzhledem k charakteru distribuce plnidla je těžké výraznější změnu pozorovat i u AS fólii, zdá se však, že celkový počet částic plnidla je nižší.

Tab. 11: Mikroskopické snímky PUR pěn a fólii kultivované na třepačce

Tab. 11: Mikroskopické snímky PCR pěny s jónovými napěvami na trepace				
		Pěna	Nedegradovaná	Degradovaná
P ě n y n a t ř e p a č c e	CA			
	AS			
	CMC			

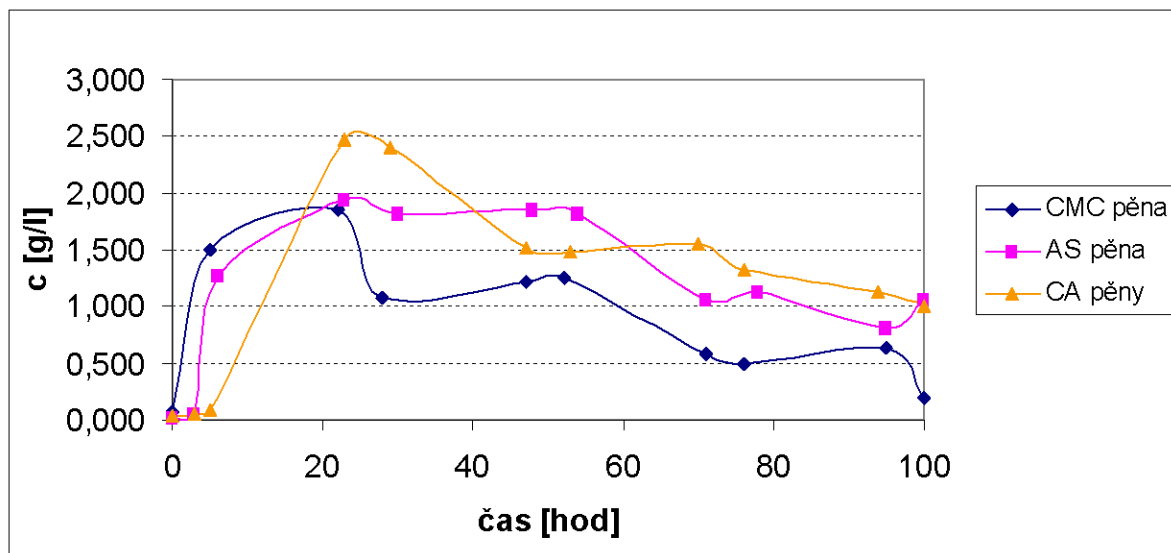


4.2.2. Kultivace ve fermentoru

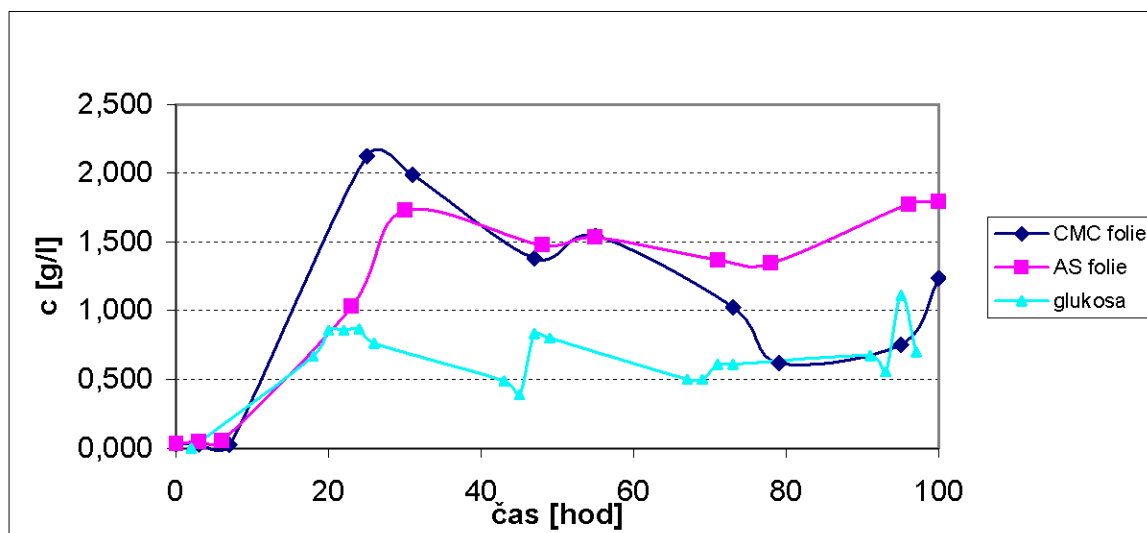
V průběhu testu byl sledován růst biomasy, vývoj CHSK a redukujících cukrů. Po ukončení kultivace byla provedena mikroskopická analýza, srovnání degradovaných PUR pěn folií s nedegradovanými. Ve fermentoru byla provedena kultivace na glukose (složení tab. 7) a kultivace v přítomnosti CMC, CA, AS pěny a CMC, AS folie. Kultivace s CA folie z důvodu technické závady na přístroji provedena nebyla.

4.2.2.1. Stanovení biomasy

V průběhu stanovení růstové křivky směsné termofilní kultury byl sledován přírůstek biomasy gravimetrickou metodou. Průběh růstové křivky byl sledován jak u kultivací s přidavkem PUR pěn (graf 13) tak i u PUR folií (graf 14) a referenční kultivaci v glukosovém mediu bez PUR (graf 14).



Graf 13: gravimetrické stanovení biomasy PUR pěn ve fermentoru



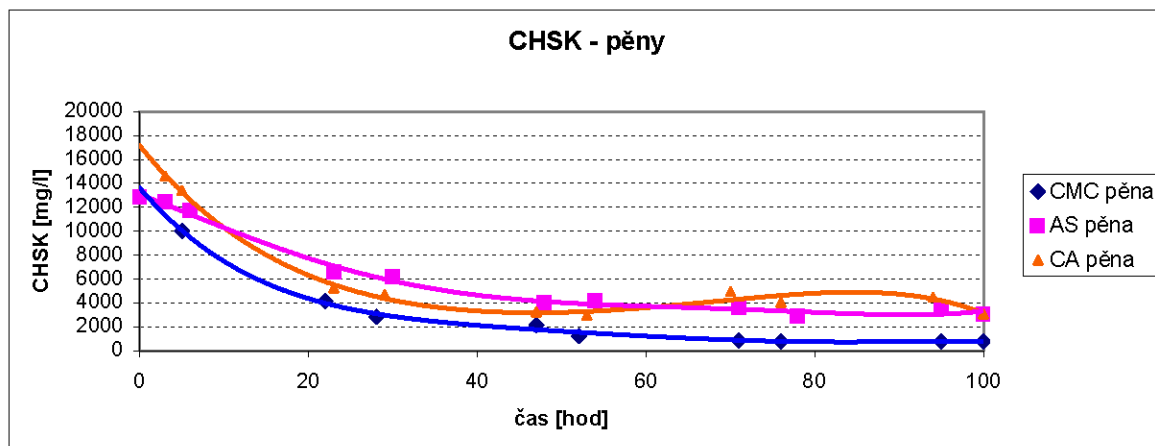
Graf 14: gravimetrické stanovení biomasy PUR folií a glukosy ve fermentoru

U všech kultivací byla v prvních 3 až 7 hodinách zaznamenána lag – fáze, poté následoval exponenciální vzrůst biomasy do cca 22. hodiny kultivace, dále stacionární fáze u referenční kultivace glukosy a kultivace v přítomnosti AS folie a AS pěny (graf 13 a 14), nebo pokles obsahu biomasy u CMC folie, CMC pěny a CA pěny (graf 13 a 14). Růstová křivka u AS pěny začala po stacionární fázi kolem 55. hodiny odumírat (graf 13), na rozdíl od průběhu růstu biomasy u kultivace referenční a v přítomnosti AS folie (graf 14). Koncentrace biomasy byla větší u kultivací s polyuretany než u kultivace referenční.

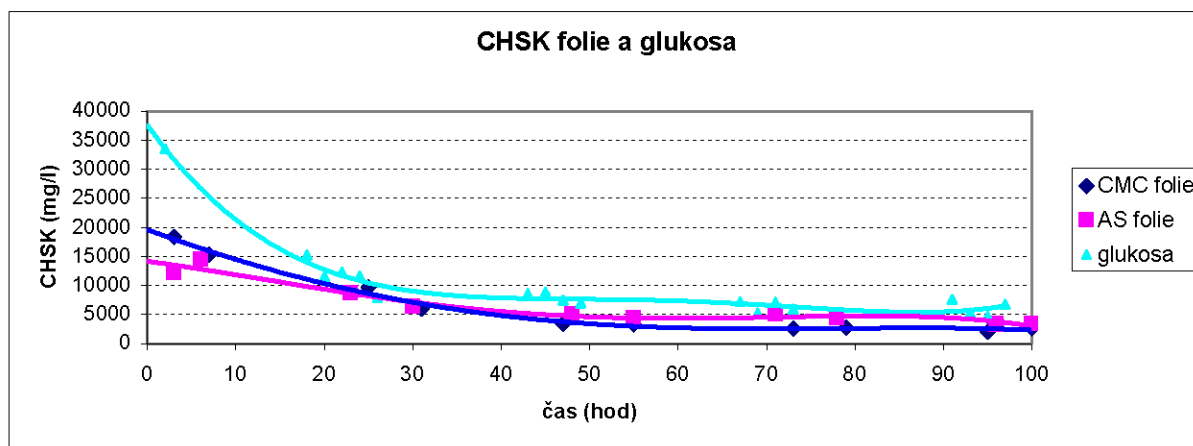
Neprojevilo se zde inhibiční účinek folií jako u kultivací na třepačce (graf 7). Tento rozdíl může být způsoben účinkem aerace ve fermentoru a tím využívání především aerobního metabolismu bakteriální kultury. Významný faktor při kultivaci na třepačce je právě limitace kyslíkem, provzdušňování je omezeno pouze na styk hladiny media s okolním vzduchem.

4.2.2.2.Stanovení CHSK

Stanovení chemické spotřeby kyslíku bylo provedeno na referenční kultivaci glukosy a kultivací v přítomnosti PUR folií a pěn.



Graf 15: Stanovení CHSK PUR pěn ve fermentoru

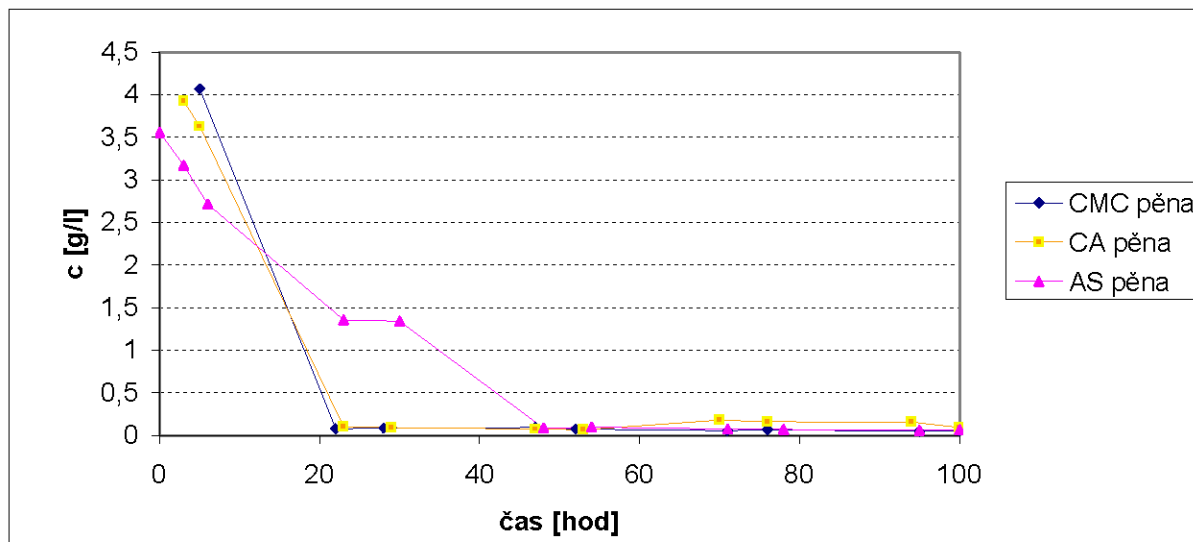


Graf 16: Stanovení CHSK PUR folií a glukosa ve fermentoru

U všech kultivací byl zaznamenán výrazný pokles hodnot CHSK do přibližně 30. – 40. hodiny kultivace, dále se CHSK spíše neměnilo (graf 15, 16). Toto zjištění odpovídá růstovým křivkám (graf 13, 14). Tedy při nárůstu biomasy docházelo k úbytku organických látek, a při fázi odumírání dále hodnoty CHSK neklesaly a ani se vlivem lýze buněk nezvyšovaly. Největší úbytek CHSK způsobovala přítomnost CMC pěny (92 %) a CMC folie (86 %), dále pak pěny CA (79 %) a AS (76 %). Nejmenší úbytek způsobovala AS folie (72 %). 80 % úbytek byl zaznamenán u kultivace glukosy bez PUR.

4.2.2.3. Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona

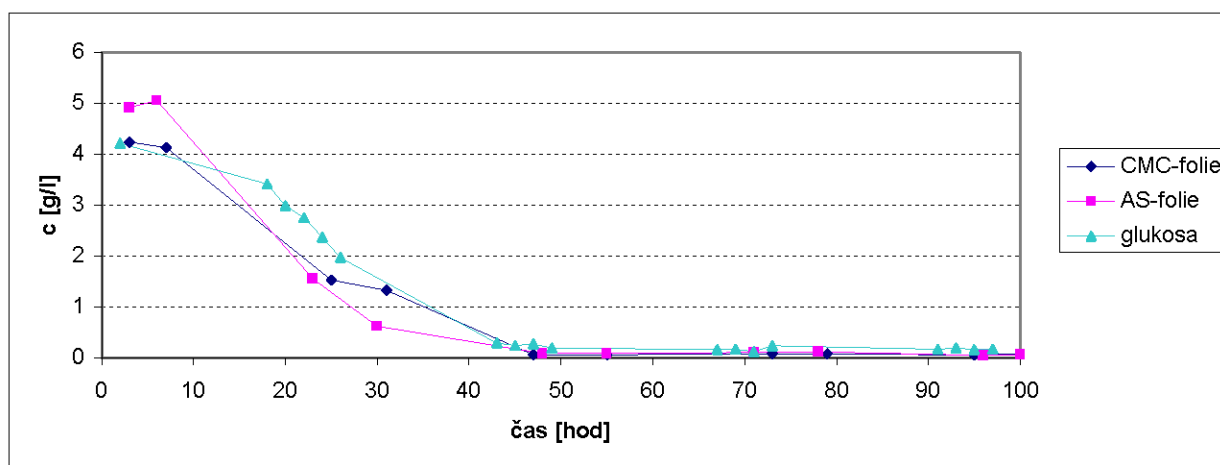
Během kultivace byly stanovovány koncentrace redukujících cukrů u fermentací s přítomností a bez přítomnosti PUR folií a pěn.



Graf 17: Stanovení redukujících cukrů PUR pěn ve fermentoru

Při kultivaci v přítomnosti CMC a CA pěn došlo k výraznému poklesu obsahu redukujícího cukru (glukosy) v prvních 22 hodinách (graf 17). V té době také začalo odumírání biomasy právě pro nedostatek cukru, který slouží buňkám jako zdroj uhlíku (graf 13).

Stacionární fáze růstu u kultivace s AS pěnou způsobilo pozvolnější využívání substrátu. Vyčerpání cukru proběhlo kolem 50. hodiny (graf 17), v této době také dochází k poklesu koncentrace biomasy ve fermentoru (graf 13).



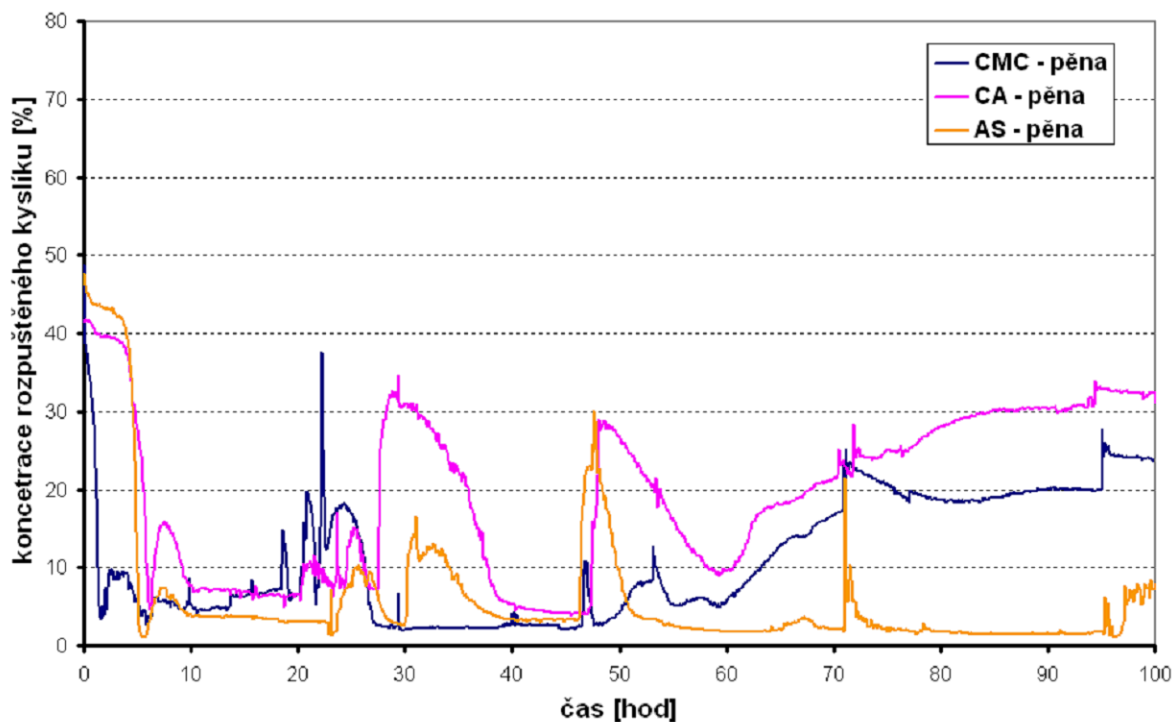
Graf 18: Stanovení redukujících cukrů PUR folií a glukosy ve fermentoru

K postupnému využívání substrátu při kultivaci referenční, v přítomnosti CMC a AS folie docházelo do přibližně 50. hodiny (graf 18). Poté byla koncentrace cukru minimální.

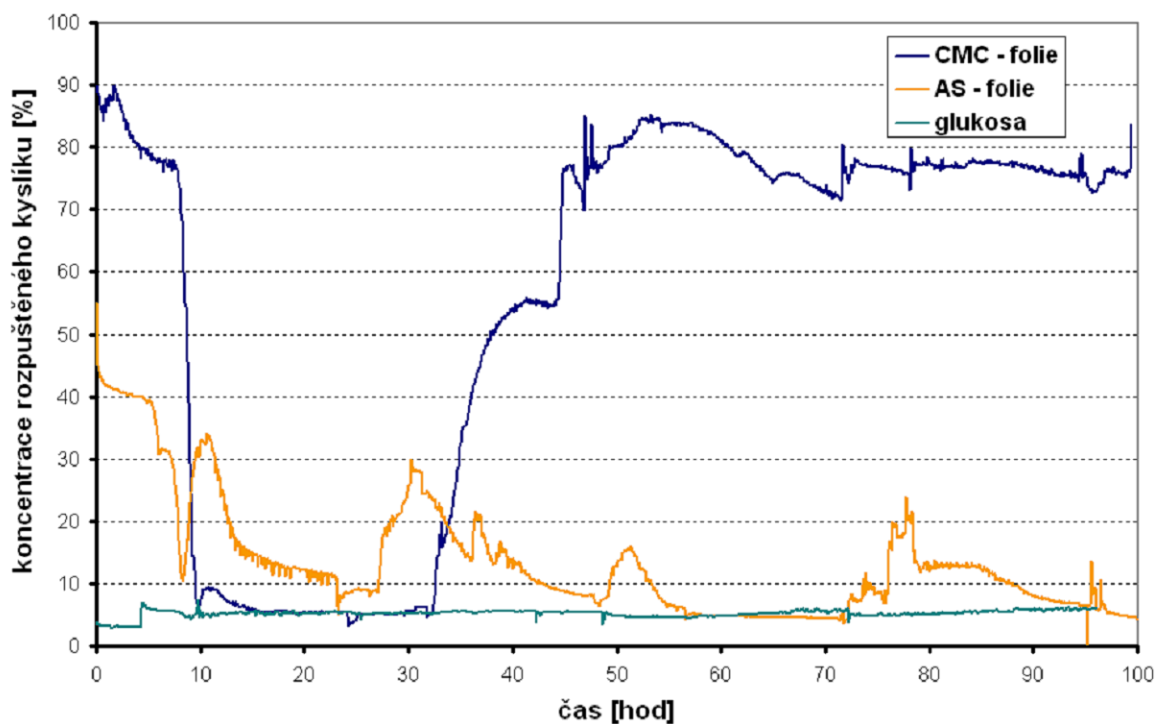
4.2.2.4. Data zpracovaná programem COMMAN

Data získaná z fermentoru byla zpracovaná programy Comman a Excel. V průběhu kultivace ve fermentoru byla programem Comman sledována koncentrace rozpuštěného kyslíku v mediu a spotřeba roztoků upravující pH na hodnotu 6,5.

4.2.2.4.1. Saturace kyslíku



Graf 19: Koncentrace rozpuštěného kyslíku PUR pěn ve fermentoru

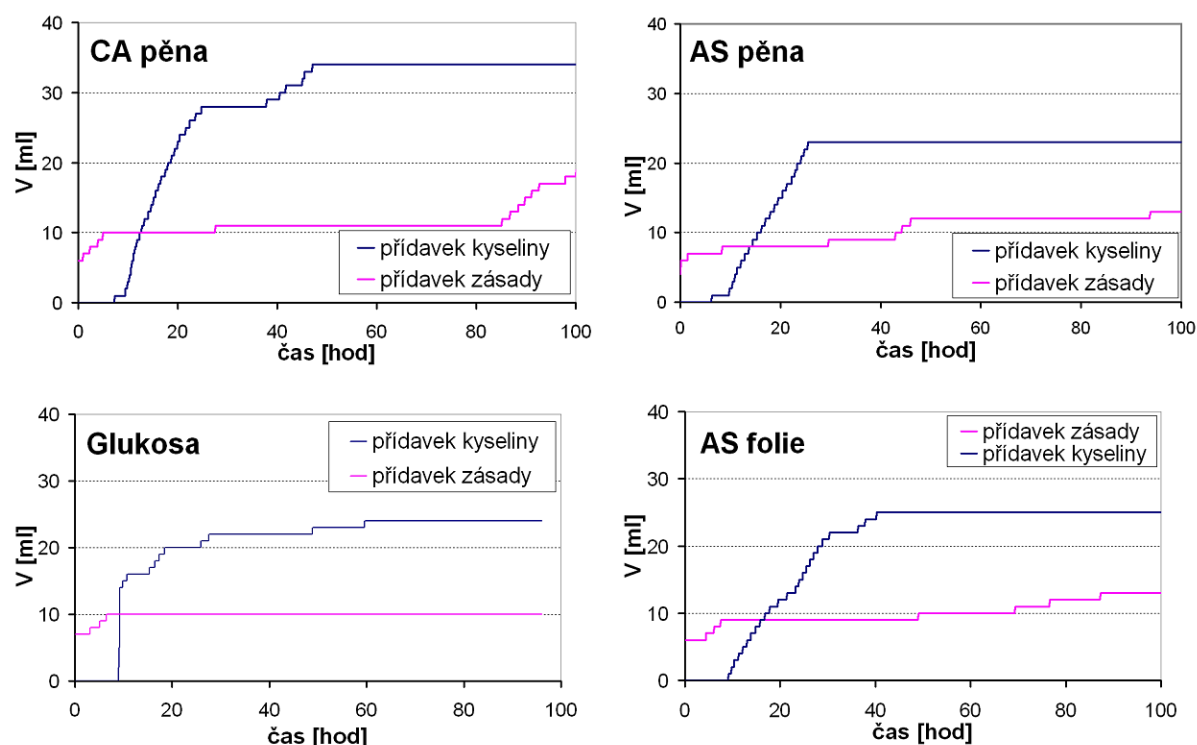


Graf 20: Koncentrace rozpuštěného kyslíku PUR folií a glukosy ve fermentoru

Saturace kyslíku u kultivací v přítomnosti PUR pěn a AS folie ve fermentoru se držela po 50 % (graf 19, 20). Koncentrace rozpuštěného kyslíku u kultivace glukosy pod 10 % (graf 20).

Největší koncentrace byla zaznamenána u kultivace CMC folie (graf 20). Tato vysoká saturace byla zapříčiněna pěněním, které mohlo být způsobeno uvolněním pěnivých látek obsažených v CMC folii. K výraznému poklesu saturace došlo přibližně v 10. hodině kultivace. Kyslík byl spotřebován pro exponenciální růst biomasy, ta trvala přibližně do 30. hodiny kultivace. Po této době docházelo k postupnému odumírání kultury a tedy k postupnému zvyšování koncentrace rozpuštěného kyslíku. Saturace kyslíku se vrátila na přibližně původní hladinu.

4.2.2.4.2. Spotřeby roztoků upravující pH



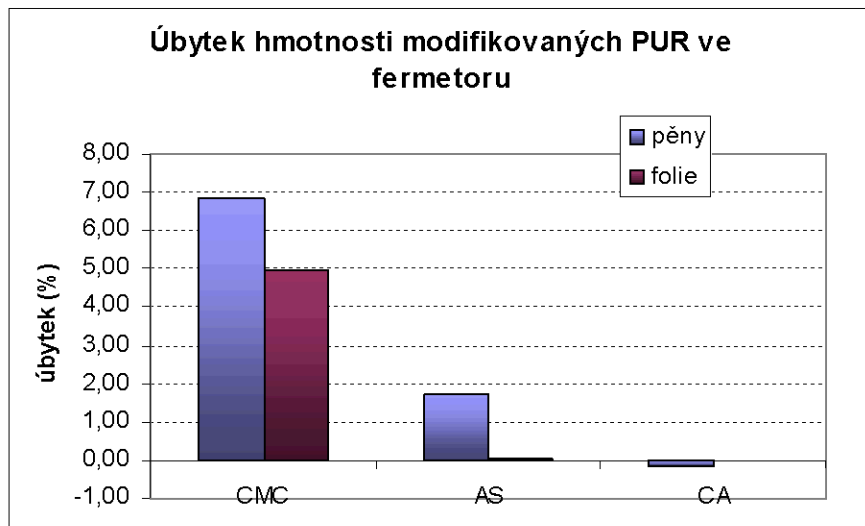
Grafy 21: Spotřeba roztoků upravujících pH ve fermentoru

Grafy 21 zobrazují přídavky kyseliny (H_2SO_4) a zásady ($NaOH$) k udržení pH na konstantní hodnotě 6,5. Tyto hodnoty byly vlivem technických poruch vyhodnoceny jen pro kultivaci referenční a v přítomnosti AS pěny, CA pěny a AS folie. Ze získaných dat lze odvodit obecné závěry pro kultivace v přítomnosti pěn i folií na glukosovém mediu.

První přídavek zásady vyrovnává pH media na hodnotu 6,5, ten se dále zvyšuje nejspíše v důsledku tvorby extracelulárních kyselin a to hlavně na začátku kultivace. V této době je přibližně kultura v tzv. lag - fázi. Prudký nárůst spotřeby kyseliny je zaznamenán kolem zhruba 10. hodiny kultivace, tento nárůst souvisí s exponenciální fází růstu biomasy a trvá přibližně po celou dobu této růstové fáze. Po zbytek kultivace obecně nedochází k velkým změnám. Další vývoj tedy nevyvolává výrazné výkyvy pH a tedy i spotřeba kyseliny a zásady je skoro neměnná.

4.2.2.5. Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií

Byly stanoveny hmotnostní úbytky PUR pěn a folií během 100 hodinové kultivace ve fermentoru. Z důvodu nedostatku PUR materiálu nebyly provedeny kontrolní kultivace v glukosovém médiu bez bakteriální kultury. Tato kontrolní kultivace měla být provedena za účelem posouzení mechanických a teplotních vlivů na celkovou míru degradace jednotlivých typů PUR u kultivace ve fermentoru.



Graf 22: Úbytek PUR folií a pěn ve fermentoru

Tab. 12: Hmotnostní úbytek PUR pěn a folií na třepačce v přítomnosti kultury

	Pěny ve fermentoru			Folie ve fermentoru	
PUR	CMC	CA	AS	CMC	AS
Úbytek (%)	6,87	-0,16	1,72	4,98	0,03

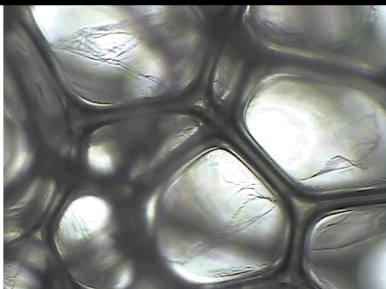
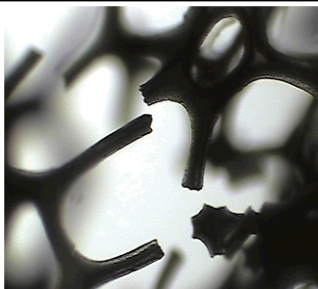
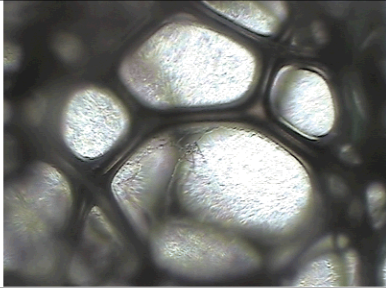
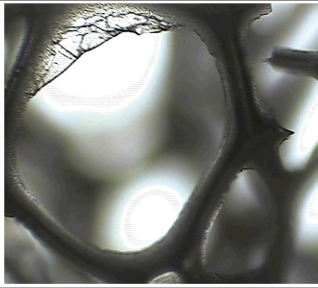
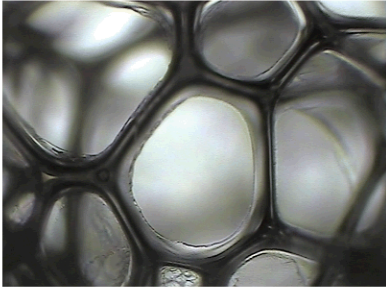
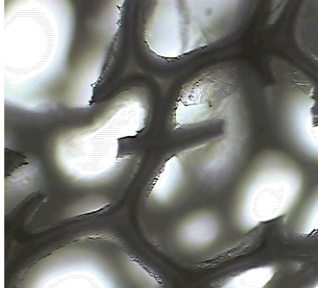
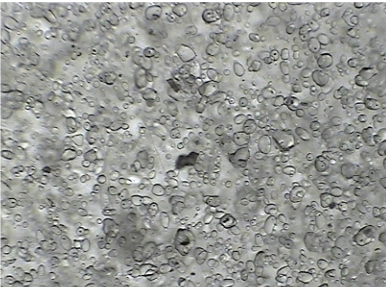
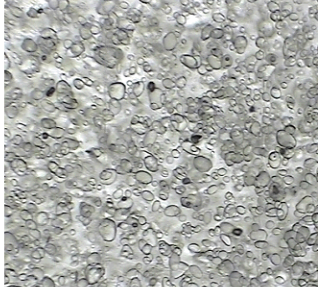
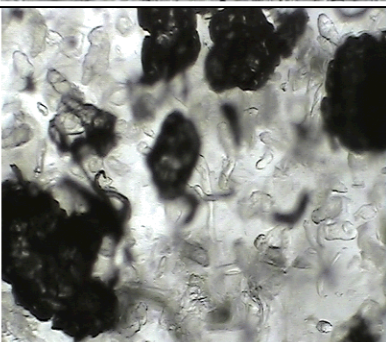
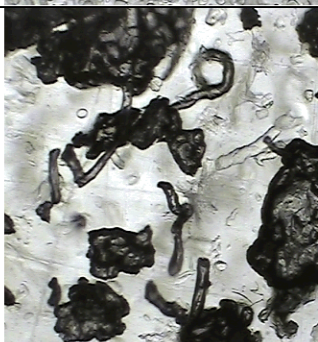
Tak jako při kultivaci v Erlenmayerových baňkách na třepačce největší úbytek hmotnosti byl zaznamenán u polyuretanů s přísadkou CMC plnidla (graf 22). Tento úbytek dosahoval až 7 % u pěn a 5 % u folií. I zde došlo k nárůstu hmotnosti CA pěny jako u kultivace na třepačce. U folií byl zaznamenán nižší hmotnostní úbytek než u pěn degradovaných kultivací ve fermentoru. U kultivace ve fermentoru byly tyto rozdíly větší, než-li u kultivace na třepačce.

4.2.2.6. Mikroskopické stanovení

Porovnáním mikroskopických obrazů polyuretanových pěn před a po biodegradaci je možno posoudit míru biodegradability testovaných vzorků při kultivaci ve fermentoru.

Největší poškození lze vidět na mikroskopických snímcích PUR pěn. Toto poškození bylo, jak se dalo teoreticky očekávat, větší než u kultivace na třepačce. Vliv na rozdílnost snímků degradace na třepačce a ve fermentoru mělo jak rozdílné míchání, tak koncentrace biomasy.

Tab. 13: Mikroskopické snímky PUR pěn a folií kultivované na třepačce

		Pěna	Nedegradovaná	Degradovaná
Pěny ve fermentoru	CA			
	AS			
	CMC			
Folie ve fermentoru	AS			
	CMC			

4.2. Výsledky degradace syrovátky

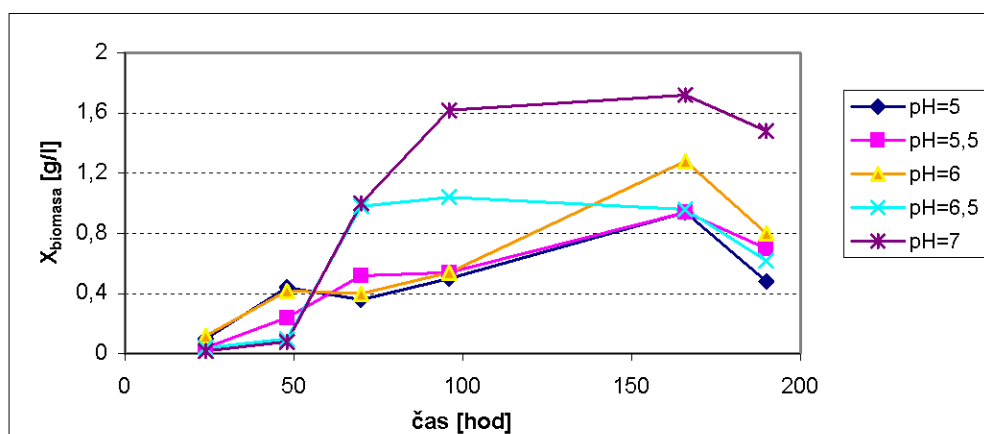
4.2.3. Kultivace na třepačce

Tímto měřením byl sledován vliv počátečního pH na degradabilitu syrovátky termofilní směsnou kulturou. Měření bylo zaměřeno na stanovení růstu biomasy, pokles CHSK a vývoj pH během kultivace.

V legendě uvedeno startovní pH syrovátky v Erlenmayerových baňkách.

4.2.3.1. Stanovení biomasy

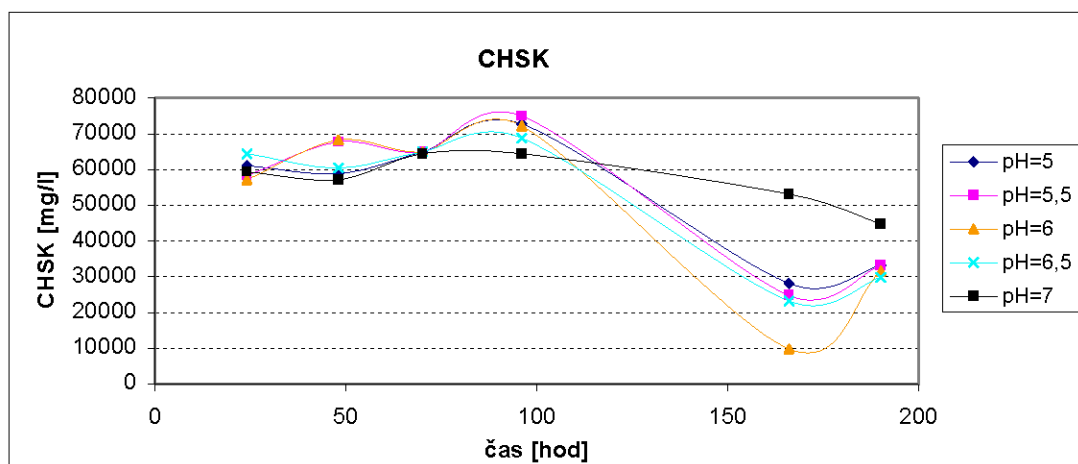
Největší nárůst biomasy byl zaznamenán u syrovátky s počátečním pH 7. U pH 7 a 6,5 lze rozlišit exponenciální a stacionární fázi růstu. Exponenciální růst začíná kolem 48. hodiny, u kultivace s počátečním pH 6,5 končí v cca 70. hodině, a ve 100. hodině končí u pH 7. U pH 5; 5,5 a 6 růst biomasy je spíše pozvolný po celou dobu kultivace (graf 23).



Graf. 23: Gravimetrické stanovení biomasy v syrovátce - kultivace na třepačce

4.2.3.2. Stanovení CHSK

Stanovení chemické spotřeby kyslíku bylo provedeno pro kultivace syrovátky v Erlenmayerových baňkách s počátečním pH 5; 5,5; 6; 6,5 a 7 (graf 24).



Graf.24: Stanovení CHSK v syrovátce - kultivace na třepačce

Během 190 hodinové degradace syrovátky při různém počátečním pH došlo k poklesu CHSK u všech kultivací. Pokles CHSK dosáhl nejnižší hodnoty ve 166. hodině a to u všech, kromě kultivace se startovním pH 7, kde nejnižší hodnota byla naměřena v posledním odebraném vzorku.

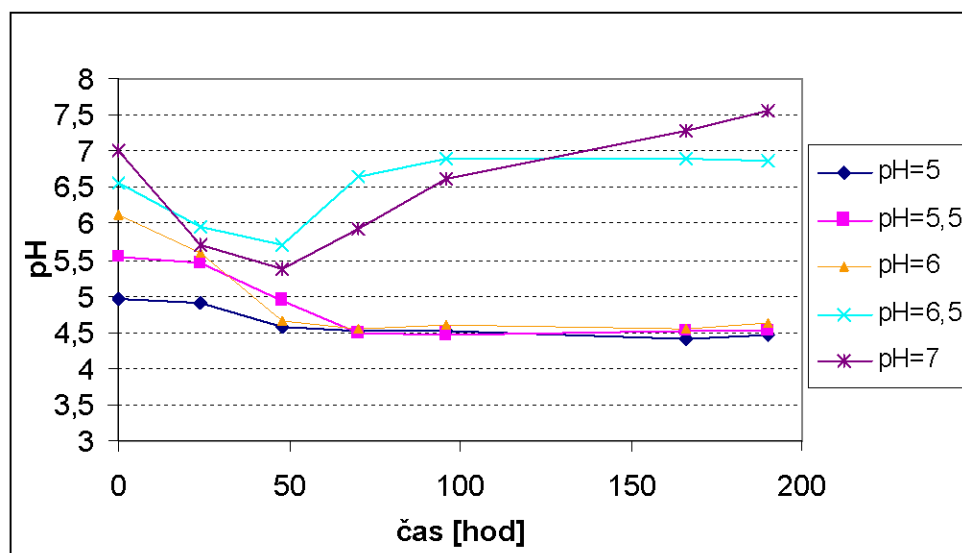
Ačkoliv u kultivace se startovním pH 7 byl zaznamenán největší přírůstek biomasy, CHSK klesala nejméně. Hodnota prvního a posledního odebraného vzorku se lišila o cca 25 %. U ostatních kultivací se snížení CHSK pohybuje kolem 50%. Největší pokles byl zaznamenán u pH 6,5.

Vzhledem k množství vyprodukované biomasy a poklesu CHSK během degradace by se dala označit kultivace při počátečním pH 6,5 jako optimální.

Porovnáním růstových křivek (graf 23) s vývojem CHSK během kultivace (graf 24) by se dalo říct, že při prudkém nárůstu biomasy, například během exponenciální fáze růstu, dochází k menšímu poklesu CHSK, než-li v době stacionární fáze růstu.

4.2.3.3. Vývoj pH během kultivace

Pomocí pH metru byl sledován vývoj pH během kultivace (graf 25, tab. 26)



Graf. 25: Vývoj pH během kultivace na třepačce

V prvních cca 48 hodinách došlo k poklesu pH ze startovních hodnot. U kultivací s počátečním pH 5; 5,5 a 6 kleslo pH na hodnotu přibližně 4,5 a po zbytek měření zůstávalo neměnné. U kultivací s počátečním pH 6,5 a 7 po 48 hodině pH vzrůstalo. Tento vzrůst byl ukončen u pH 6,5 v 96. hodině na hodnotě přibližně 7, ale u pH 7 dále stoupalo až do ukončení měření a bylo vyšší než počáteční.

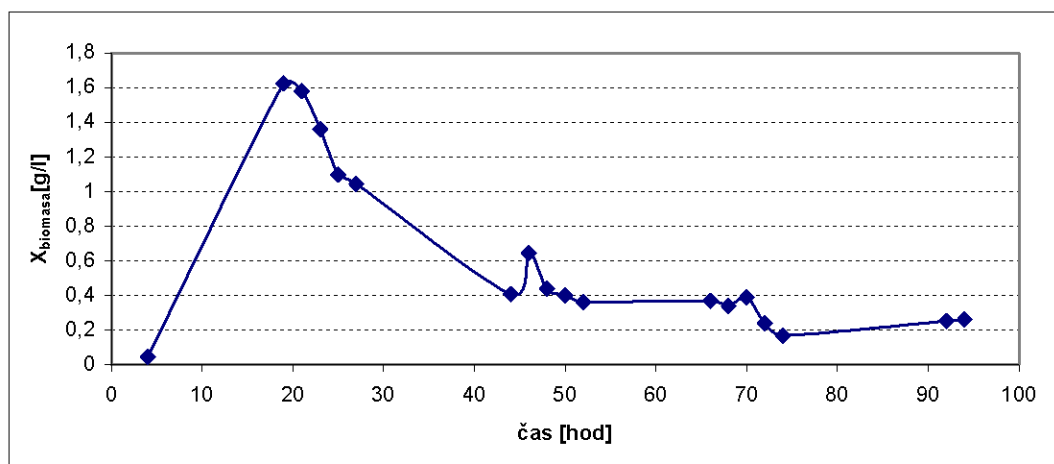
U kultivace s počátečním pH 6,5 a 7 došlo k většímu nárůstu biomasy než u ostatních kultivací. Vyšší pH je tedy výhodnější pro růst termofilní směsné kultury.

4.2.4. Kultivace ve fermentoru

V průběhu testu byl sledován růst biomasy, vývoj CHSK a redukujících cukrů. Po ukončení kultivace byla stanovena přítomnost laktosy, glukosy a galaktosy ve vzorcích nedegradované předupravené syrovátky, syrovátky po dvou hodinách biodegradace ve fermentoru a vzorku syrovátky po skončení degradace metodou TLC chromatografie.

4.2.4.1. Stanovení biomasy

V průběhu degradace syrovátky směsnou termofilní kulturou ve fermentoru byl sledován přírůstek biomasy gravimetrickou metodou (graf 26).

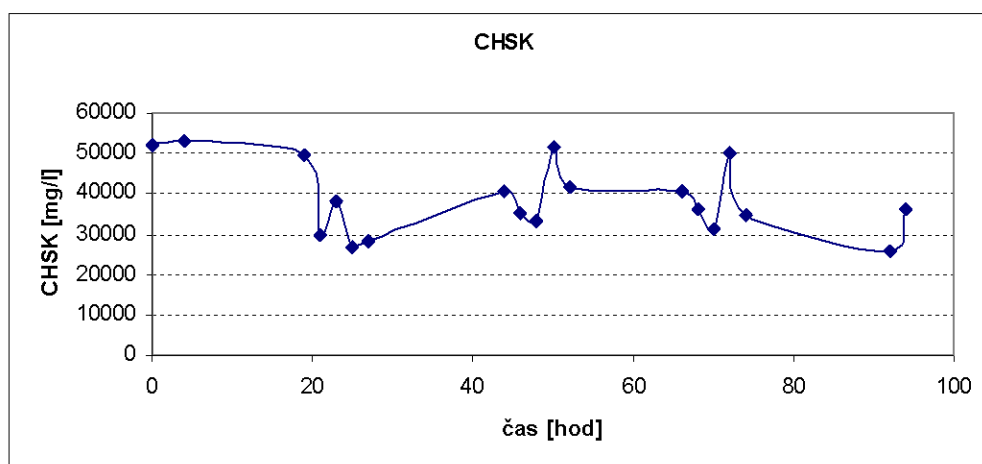


Graf 26: Gravimetrické stanovení biomasy v syrovátce - kultivace ve fermentoru

Největší nárůst biomasy byl zaznamenán v prvních 20 hodinách kultivace, poté docházelo k postupnému odumírání kultury.

4.2.4.2. Stanovení CHSK

Ze vzorků odebraných z fermentoru byla stanovena chemická spotřeba kyslíku. Průběh stanovení je zobrazen v grafu 27.

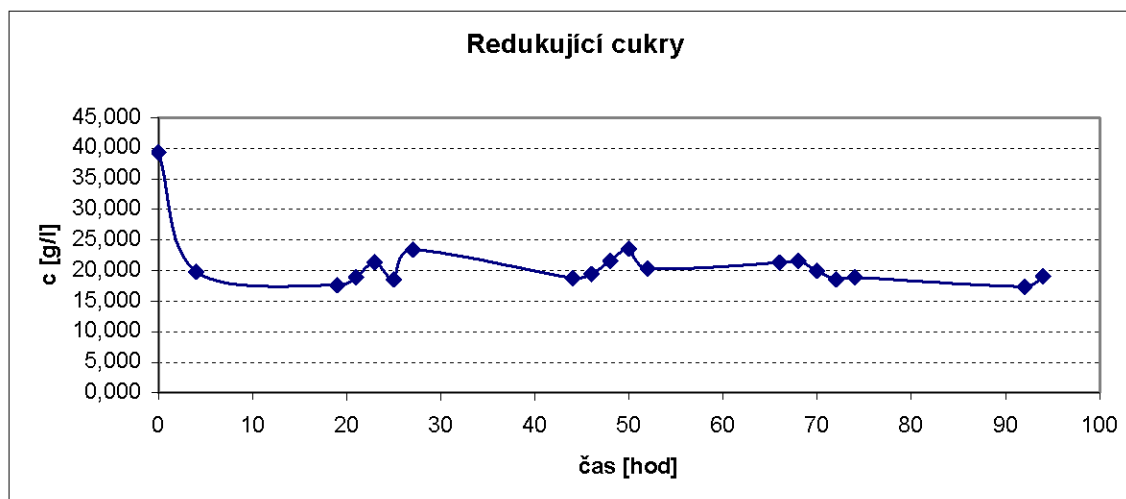


Graf 27: Stanovení CHSK v syrovátce - kultivace ve fermentoru

V době exponenciálního růstu biomasy, tedy do 20. hodiny kultivace, nedocházelo k poklesu CHSK. Poté došlo k výraznému úbytku a posléze k zpětnému nárůstu koncentrace CHSK vlivem lýze buněk. Celkový rozdíl mezi koncentrací CHSK na začátku a na konci kultivace činil přibližně 30 %.

4.2.4.3. Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelsona

Během degradace syrovátky byla v jednotlivých odebraných vzorcích stanovována koncentrace redukujících cukrů. Úbytek redukujících cukrů je zobrazen v grafu 28.



Graf. 28: Stanovení redukujících cukrů v syrovátce - kultivace ve fermentoru

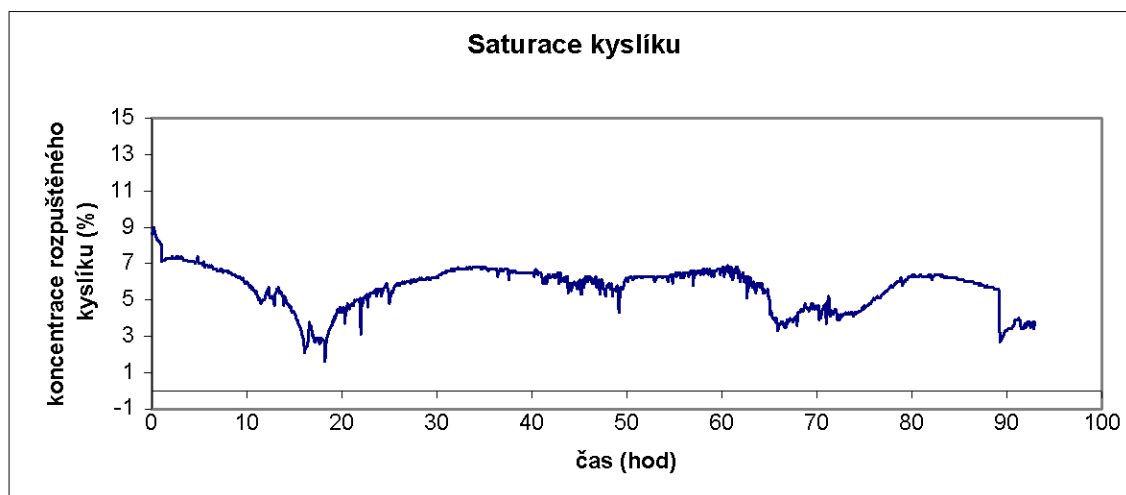
Největší úbytek byl zaznamenán 4 hodiny od počátku degradace. Obsah redukujících cukrů klesl cca o 50 %. Po zbytek kultivace se obsah dále výrazně neměnil.

4.2.4.4. Data zpracovaná programem COMMAN

Data získaná z fermentoru byla zpracována programy Comman a Excel. V průběhu kultivace syrovátky ve fermentoru byla programem Comman sledována koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu (graf 29) a spotřeba roztoků upravující pH na hodnotu 6,5 (graf 30).

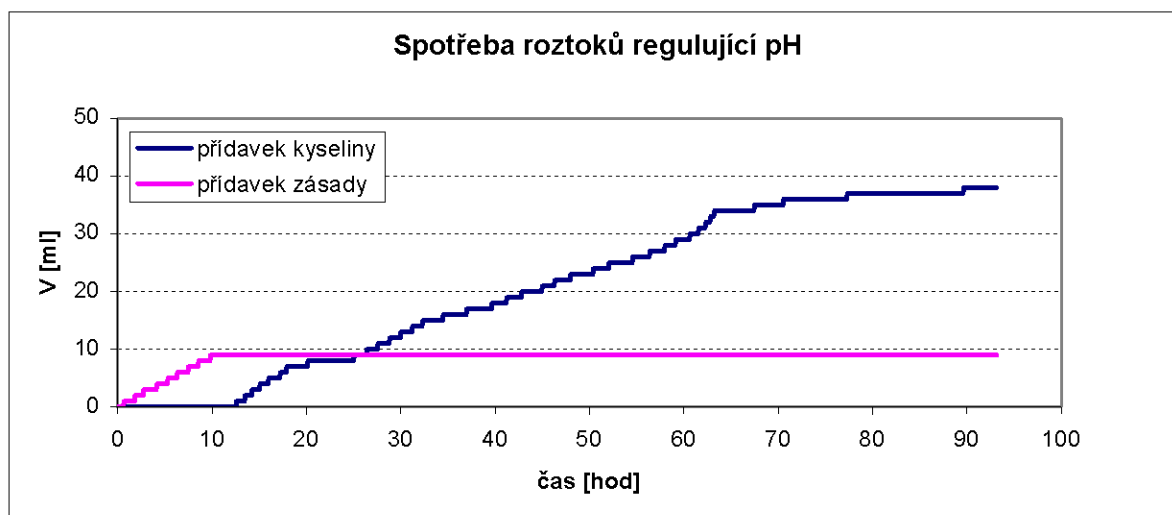
4.2.4.4.1. Saturace kyslíku

Saturace kyslíku v syrovátkovém mediu nepřesahovala 10 %. V době exponenciálního růstu, tzn. do 20. hodiny kultivace, docházelo ke snižování koncentrace rozpuštěného kyslíku, tedy tento kyslík byl spotřebován pro růst biomasy. Dále saturace kyslíku vzrostla a to v důsledku odumírání kultury.



Graf 29: Saturace kyslíku v syrovátce

4.2.4.4.2. Spotřeby roztoků upravující pH



Graf 30: Spotřeba regulačních roztoků

Graf 30 zobrazuje přídavky kyseliny (H_2SO_4) a báze (NaOH) k udržení pH na konstantní hodnotě 6,5. Na začátku kultivace dochází k nárůstu spotřeby zásady a to v důsledku tvorby extracelulárních kyselin. V předpokládaném počátku exponenciální fáze růstu, tzn. přibližně kolem 10. hodiny, se spotřeba zásady ukončila a začíná přídavek kyseliny, který trvá přibližně do 20. hodiny, kde dochází ke krátké stacionární fázi, pH je v rovnováze a tedy není potřeba přídavku regulačních roztoků. Poté dochází k odumírání biomasy, což se projeví dalším nárůstem spotřeby kyseliny, která vyrovnává zvyšující se pH, vlivem uvolňování bazických látek do media z lyzovaných buněk.

4.2.4.5. Kvalitativní stanovení cukrů metodou TLC chromatografie

Metodou TLC chromatografie byla stanovována přítomnost laktosy, glukosy a galaktosy ve vzorcích nedegradované předupravené syrovátky, syrovátky po dvou hodinách biodegradace ve fermentoru a vzorku syrovátky po skončení degradace.



1. laktosa
2. glukosa
3. galaktosa
4. nedegradovaná předupravená syrovátka
5. syrovátka po dvou hodinách biodegradace
6. syrovátka po skončení degradace

Obr. 6: TLC chromatogram

U žádného vzorku (4., 5. a 6.) nebyla prokázána přítomnost glukosy a galaktosy, které by se mohly tvořit při štěpení laktosy. Jelikož se jedná o redukující cukry, mohl by jejich vznik maskovat úbytek laktosy v průběhu fermentace. TLC chromatografie však tuto teorii nepotvrdila.

5. ZÁVĚR

Účelem této diplomové práce bylo studium biodegradability modifikovaných polyuretanových materiálů (pěn a folií) a syrovátky využitím degradačních schopností termofilní bakteriální kultury.

Jako modifikační činidla polyuretanových materiálů byla použita acetylovaná celulóza (CA), karboxymethylcelulóza (CMC) a acetylovaný škrob (AS). Kultivace PUR probíhaly ve fermentoru a v Erlenmayerových baňkách na temperované třepačce v glukosovém mediu.

Růst směsné termofilní kultury v Erlenmayerových baňkách nejlépe podporovaly polyuretanové pěny, které dokázala bakteriální kultura využít jako další substrát po vyčerpání glukosy z media. Abiotickým rozpadem folií pravděpodobně vznikaly toxické štěpné produkty, které inhibovaly růst bakteriální kultury.

Pokles chemické spotřeby kyslíku (CHSK) je nejvýraznější u kultivace v přítomnosti polyuretanových pěn a to hlavně modifikovaných CA a CMC plnidly. CHSK u kultivací obsahující polyuretanové folie se měnilo jen málo.

PUR pěny a folie se stejným modifikačním činidlem kultivované na třepačce dosahovaly přibližně stejného hmotnostního úbytku. Největší úbytek byl zaznamenán u polyuretanů s přídavkem CMC plnidla (7 %). Hlavní úlohu při degradaci sehraává abiotický vliv, který je nejvýraznější u polyuretanů ve formě pěn.

Růst směsné termofilní kultury ve fermentoru v přítomnosti polyuretanů byl vyšší než u srovnávací kultivace bez PUR. Inhibiční účinek PUR folií se zde neprojevil, nejspíše vlivem aerace. Tedy PUR pěny i folie podporovaly růst biomasy, pokud byla kultivace provedena ve fermentoru. Při kultivaci ve fermentoru byl zaznamenán výrazný úbytek CHSK u všech druhů pěn i folií. Nejvýrazněji se projeví PUR s přídavkem CMC plnidla. Tak jako u kultivací na třepačce největšího hmotnostního úbytku bylo dosaženo degradací PUR pěny modifikované CMC plnidlem.

Degradace syrovátky byla provedena jako kultivace ve fermentoru a kultivace při různých počátečních pH v Erlenmayerových baňkách v temperované třepačce.

Největší nárůst biomasy ve fermentoru byl zaznamenán v 20. hodině kultivace. V této době došlo také k maximálnímu poklesu CHSK a koncentrace redukujících cukrů. Koncentrace laktosy a CHSK se snížila o přibližně 50%. Chromatografie nepotvrdila přítomnost glukosy a galaktosy, jako produktů štěpení laktosy.

Z měření v Erlenmayerových baňkách při různém počátečním pH vyplynulo, že optimální pH pro biodegradaci syrovátky směsnou termofilní kulturou při teplotě 60 °C je pH 6,5.

Chemické složení syrovátky, která je vedlejším produktem při výrobě různých druhů sýrů a tvarohu, se může lišit. Toto složení závisí na druhu vyráběného produktu, na původním mléce a na procesech výroby a úpravy.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Zpracování syrovátky v Evropě* [online]. 2001 [cit. 2008-04-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=152&ch=13&typ=1&val=3304>>.
- [2] DRDÁK, M., et al. *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. BRATISLAVA : Malé Centrum, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [3] *Vývoj trhu s výrobky ze syrovátky a laktózy* [online]. 2008 [cit. 2008-05-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=153&ch=13&typ=1&val=71895>>.
- [4] SUKOVÁ, I. *Syrovátka v potravinářství*. PRAHA : Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. 36 s. ISBN 80-7271-173-3.
- [5] ČEPIČKA, Jaroslav, et al. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. PRAHA : VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- [6] KADLEC, Pavel, et al. *Technologie potravin II*. PRAHA : VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [7] *Které bílkoviny obsahuje mléko?* [online]. 2007 [cit. 2008-05-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.food-info.net/cz/qa/qa-fp1.htm>>.
- [8] *Kasein* [online]. 2008 [cit. 2008-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kasein>>.
- [9] *Health-Enhancing Properties of Dairy Ingredients : Composition of Whey* [online]. 2001 [cit. 2008-05-24]. Dostupný z WWW: <<http://www.nationaldairycouncil.org/NationalDairyCouncil/Health/Digest/dcd72-2Page3.htm>>.
- [10] GERMAN, J.B., C.J. DILLARD, and R.L. WALZEM. U.S. *Whey Products and Dairy Ingredients for Health: A Review*. May 2000. U.S. Dairy Export Council. In press. 2001.
- [11] HARPER, W.J. *Biological Properties of Whey Components. A Review*. Chicago, IL: The American Dairy Products Institute. 2000.
- [12] FORMAN, L., MERGL, M. a kol. *Syrovátka a její užití v lidské výživě a ve výživě zvířat*. PRAHA: Středisko technických informací potravinářského průmyslu VÚPP, 1979. 343 s.
- [13] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 1. vyd. OSTRAVA: Pavel Klouda, 2000. 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [14] *Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives* [online]. 2007 [cit. 2008-05-01]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova_2/1all.pdf>.
- [15] FISCHEROVÁ, L. *Studium biodegradace syrovátky termofilními baktériemi*. BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 66s.
- [16] *Health promoting effects of prebiotic galacto-oligosaccharides* [online]. 2007 [cit. 2008-05-01]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova_2/4all.pdf>.
- [17] *Lactulose as a Prebiotics, and Enhancement of Calcium and Magnesium Absorption* [online]. 2007 [cit. 2008-05-01]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova_2/3all.pdf>.
- [18] *LACTOSE MALDIGESTION/LACTOSE INTOLERANCE* [online]. [cit. 2008-05-04]. Dostupný z WWW: <[17] <http://www.nationaldairycouncil.org/NR/rdonlyres/B1F83240-8985-4846-8FC2-0AEE0601A379/0/Cal5w.pdf>>.

- [19] *Nové syrovátkové výrobky* [online]. 2006 [cit. 2008-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=0&typ=1&val=42957&ids=0>>.
- [20] *Růst světové produkce a využití syrovátky* [online]. 2004 [cit. 2008-04-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=418&ch=13&typ=1&val=23143>>.
- [21] *Trendy ve zpracování syrovátky* [online]. 2006 [cit. 2008-04-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=314&ch=13&typ=1&val=44733>>.
- [22] *Aplikace syrovátkové bílkoviny do chleba* [online]. 2006 [cit. 2008-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=0&typ=1&val=43316&ids=0>>.
- [23] *Nízkoenergetické uzeniny se syrovátkovou bílkovinou* [online]. 2006 [cit. 2008-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=0&typ=1&val=43445&ids=0>>.
- [24] MLEZIVA J., ŠŇUPÁREK J. *Polymery – výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Sobotáles, 2000. 128-132 s. ISBN 80-85920-72-7.
- [25] DUCHÁČEK, V. *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. PRAHA : Vysoká škola chemicko-technologická, 2006. 280 s. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-617-6/pages-img/096.html>. ISBN 80-7080-617-6.
- [26] PROKOPOVÁ, Irena. *Makromolekulární chemie*. PRAHA : VŠCHT , 2007. 207 s. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-662-3/pages-img/183.html>. ISBN 978-80-7080-662-3.
- [27] GUNTER, O. *Polyurethane Handbook*. MUNICH : Hanser Publisher, 1994.
- [28] HORÁKOVÁ, D. *Bioremediace*, BRNO: PřMU Ústav experimentální biologie, 2006.
- [29] LANDA, I. *Aktivní ochrana biologickými metodami*. PRAHA : ČZU, 2006.
- [30] On-line, dostupné z: *Testování biodegradability* [online]. 1997 [cit. 2008-04-23]. Dostupný z WWW: <http://stary.biom.cz/clen/as/biodegr_test.html>.
- [31] On-line, dostupné z: *Bakterie* [online]. [cit. 2008-04-15]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakterie>>.
- [32] OBRUČA, Stanislav. *Využití různých typů bakterií k produkci a biodegradaci modifikovaných kompozitních materiálů a jejich složek*. BRNO : Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu potravinářské chemie a biotechnologie, 2007. 113 s.
- [33] CHIELLINI, E., GIL, H., BRAUNEGG, G., BURCHERT, J., GATENHOLM, P., van der ZEE, M. *Biorelated Polymers - Sustainable Polymer Science and Technology*. Springer – Verlag, 2001. 63-86 s. ISBN 1-59124-649-0.
- [34] WYPYCH, G. *Handbook of plasticizers*. ChemTec Publishing, 2004. 241 – 243 s. ISBN 1-59124-705-5.
- [35] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie*. 2. vyd. PRAHA : Victoria Publishing, 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [36] BROCK, T. D. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer. 1978. ISBN 0-387-90309-7.
- [37] NOVÁKOVÁ, Z. *Možnosti biodegradace modifikovaných polyuretanů termofilními mikroorganismy*. BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2006.
- [38] HORÁKOVÁ, M. a kol. *Analytika vody*. PRAHA: VŠCHT, 2000. ISBN 80-7080-520-1.
- [39] LAPARA, T. M., ALLEMAN, J. E. *Thermophilic aerobic biological wastewater treatment*. Water Research, 1999, vol. 33, is. 4, pp. 895-908. ISSN 0043-1354.

- [40] FRANKOVÁ, T. *Aplikace termofilních mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 40 s.
- [41] *Principy uchovávání potravin* [online]. [cit. 2008-05-20]. Dostupný z WWW: <http://smetana.fch.vutbr.cz/r_studenti/4.rocnik/UCHPBT>.
- [42] *Charakteristika rodu a tvorba spor* [online]. [cit. 2008-04-28]. Dostupný z WWW: <<http://sweb.cz/kolar-jiri/jirka/detaily/charakt.htm>>.
- [43] *Gram-positive, Aerobic or Facultative Endospore-forming Bacteria (formerly, \"The Genus Bacillus\")* [online]. 2008 [cit. 2008-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>>.
- [44] *Thermus* [online]. [cit. 2008-05-01]. Dostupný z WWW: <<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Thermus>>.
- [45] KOSSEVA, M.R., KENT, C.A., LLOYD, D.R. *Thermophilic bioremediation of whey: effect of physico-chemical parameters on the efficiency of the process*. Biotechnology Letters. 2001, no. 23, s. 1675-1679.
- [46] *Dispersní a koloidní systémy* [online]. [cit. 2008-04-13]. Dostupný z WWW: <<http://referaty-seminarky.cz/dispersni-a-koloidni-systemy>>.
- [47] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. OSTRAVA : Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-05.
- [48] KAŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. PRAHA : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. 138 s. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pages-img/001.html>. ISBN 80-7080-586-2.
- [49] VOLKA, K., TKADLECOVÁ, M., ZÁRIBA, K. *Příklady z analytické chemie pro bakaláře*. 1. vyd. PRAHA: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. 101 s. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-610-9/pages-img/obalka-1.html>. ISBN 80-7080-610-9.
- [50] BABÁK, L.: *Modelování a optimalizace kultivací průmyslově důležitých termofilních mikroorganismů*, Brno 2005. Disertační práce. Fakulta chemická, VUT v Brně.
- [51] KAŠTÁNEK, F.: *Bioinženýrství*, Academia, PRAHA 2001.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Turbidita [NTU] - zákal

X_{biomasy} [g.l⁻¹] - koncentrace biomasy

CHSK [mg.l⁻¹] - chemická spotřeba kyslíku (COD)

A_(600nm) - absorbance při vlnové délce 600 nm

A_(530nm) - absorbance při vlnové délce 530 nm

c_{red.cukrů} [g.l⁻¹] - koncentrace redukujících cukrů

čas[hod] - doba kultivace

GOS – galaktooligosacharidy

GMP – glykomakropeptidy

WPC – syrovátkový koncentrát

WPI – izolát syrovátkových bílkovin

GC – plynová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

CC – kolonová chromatografie

PP – papírová chromatografie

TLC - chromatografie na tenké vrstvě

PŘÍLOHY

Tabulky Kalibrace

Příloha 1: Kalibrace turbidimetrického stanovení biomasy

Naměřené data kalibrace pro PUR pěn a PUR folie (graf 1,2)

Kalibrační křivka PUR pěn		Kalibrační křivka PUR folií	
Turbidita [NTU]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	Turbidita [NTU]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]
182	0,7	3	0
191	0	4	0
218	0,22	77	0,42
333	0,22	173	0,54
461	0,42	371	0,58
508	0,56	377	1,06
536	1,04	377	0,5
1558	0,92	379	0,62
1652	1,04	392	1,2
1726	1,14	396	0,94
		590	404
		377	590
		379	633

Příloha 2: Kalibrace CHSK

Naměřené data kalibrace CHSK (graf 3)

CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)
100	0,026
200	0,036
400	0,084
600	0,128
800	0,165
1000	0,203

Příloha 3: Kalibrace redukujících cukrů – laktosa

Naměřené data kalibrace laktosy (graf 4)

c _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)
0,05	0,068
0,10	0,164
0,15	0,282
0,20	0,278
0,25	0,444
0,30	0,434
0,35	0,553
0,40	0,699
0,45	0,773

Příloha 4: Kalibrace redukujících cukrů – glukosa

Naměřené data kalibrace glukosy (graf 5)

$C_{red.cukrů} [g.l^{-1}]$	$A_{(530nm)}$
0,2	0,929
0,18	0,815
0,16	0,731
0,14	0,626
0,12	0,584
0,1	0,495
0,08	0,325
0,06	0,253
0,04	0,154

Kultivace termofilní kultury v přítomnosti PUR na třepačce

Příloha 5: Turbidimetrické stanovení biomasy PUR pěn – kultivace na třepačce

Naměřené data stanovení biomasy u kultivace v přítomnosti PUR pěn (graf 6)

čas[hod]	CMC		AS		CA		Slepý	
	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$
0	18	0,038	18	0,038	18	0,038	18	0,038
19	218	0,202	333	0,296	461	0,401	191	0,180
26	710	0,604	742	0,630	824	0,698	159	0,153
44	536	0,462	508	0,439	594	0,509	182	0,172
50	523	0,451	706	0,601	1028	0,865	163	0,157
69	1726	1,436	1652	1,375	1558	1,298	749	0,636
74	1618	1,347	1806	1,501	1580	1,316	846	0,716
92	1990	1,652	1657	1,379	1420	1,185	880	0,743

Příloha 6: Turbidimetrické stanovení biomasy PUR folií – kultivace na třepačce

Naměřené data stanovení biomasy u kultivace v přítomnosti PUR folií (graf 7)

čas[hod]	CMC		AS		CA		Slepý	
	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$	Turbidita [NTU]	$X_{biomasy} [g.l^{-1}]$
0	3	0,000	3	0,000	3	0,000	3	0,000
4	5	0,000	4	0,000	4	0,000	4	0,000
22	173	0,312	371	0,786	77	0,084	541	1,191
28	219	0,421	404	0,865	178	0,323	633	1,411
46	377	0,800	396	0,845	392	0,835	590	1,309
52	364	0,768	377	0,800	590	1,309	626	1,394
69	489	1,068	377	0,799	566	1,250	571	1,263
75	534	1,174	382	0,812	655	1,465	652	1,457
93	506	1,107	379	0,804	603	1,340	579	1,283
100	630	1,403	350	0,735	731	1,645	538	1,185

Příloha 7: Stanovení CHSK PUR pěn na třepačce

Naměřené data CHSK u kultivace v přítomnosti PUR pěn (graf 8)

čas[hod]	CMC		AS		CA		Slepý	
	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]
3	0,099	16150	0,110	17983	0,075	12150	0,098	15983
19	0,065	10483	0,097	15817	0,065	10483	0,064	10317
26	0,080	12983	0,108	17650	0,058	9317	0,073	11817
44	0,079	12817	0,075	12150	0,037	5817	0,097	15817
50	0,067	10817	0,082	13317	0,041	6483	0,076	12317
69	0,056	8983	0,093	15150	0,038	5983	0,058	9317
74	0,045	7150	0,093	15150	0,029	4483	0,060	9650
92	0,036	5650	0,067	10817	0,010	1317	0,059	9483

Příloha 8: Stanovení CHSK PUR folií na třepačce

Naměřené data CHSK u kultivace v přítomnosti PUR folií (graf 9)

čas[hod]	CMC		AS		CA		Slepý	
	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]
4	0,097	15817	0,111	18150	0,109	17817	0,088	14317
22	0,091	14817	0,092	14983	0,087	14150	0,069	11150
28	0,085	13817	0,103	16817	0,108	17650	0,077	12483
46	0,09	14650	0,095	15483	0,078	12650	0,077	12483
52	0,094	15317	0,103	16817	0,07	11317	0,084	13650
69	0,092	14983	0,1	16317	0,07	11317	0,073	11817
75	0,092	14983	0,092	14983	0,071	11483	0,074	11983
93	0,091	14817	0,088	14317	0,091	14817	0,09	14650
100	0,081	13150	0,097	15817	0,099	16150	0,082	13317

Příloha 9: Stanovení redukujících cukrů PUR pěn na třepačce

Naměřené data stanovení redukujících cukrů u kultivace v přítomnosti PUR pěn (graf 10)

čas[hod]	CMC		AS		CA		Slepý	
	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
3	0,567	4,123	0,673	4,894	0,631	4,589	0,614	4,465
19	0,507	3,687	0,493	3,585	0,630	4,582	0,451	3,280
26	0,484	1,056	0,493	3,585	0,647	4,705	0,389	2,829
44	0,093	0,203	0,417	0,910	0,375	0,818	0,374	2,720
50	0,153	0,334	0,128	0,279	0,057	0,124	0,364	2,647
69	0,114	0,249	0,038	0,083	0,028	0,061	0,685	1,494
74	0,095	0,207	0,057	0,124	0,072	0,157	0,420	0,916
92	0,012	0,026	0,033	0,072	0,015	0,033	0,089	0,194

Příloha 10: Stanovení redukujících cukrů PUR folií na třepačce

Naměřené data stanovení redukujících cukrů u kultivace v přítomnosti PUR folií (graf 11)

čas[hod]	CMC		AS		CA		Slepý	
	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
4	0,602	4,378	0,547	3,978	0,610	4,436	0,629	4,574
22	0,554	4,029	0,276	2,007	0,406	2,953	0,151	1,098
28	0,456	3,316	0,275	2,000	0,409	2,974	0,15	1,091
46	0,334	2,429	0,284	2,065	0,330	2,400	0,138	1,004
52	0,966	2,108	0,297	2,160	0,243	1,767	0,145	1,055
69	0,471	1,028	0,307	2,233	0,255	1,854	0,139	1,011
75	0,416	0,908	0,952	2,077	0,212	1,542	0,161	1,171
93	0,428	0,934	0,995	2,171	0,130	0,945	0,161	1,171
100	0,467	1,019	0,954	2,081	0,130	0,945	0,154	1,120

Kultivace termofilní kultury v přítomnosti PUR ve fermentoru**Příloha 11: Výsledky kultivace v přítomnosti CMC pěny ve fermentoru**

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 13, 15, 17)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
0	0,073				
5	1,502	0,253	10036	0,233	4,067
22	1,860	0,085	4145	0,36	0,079
28	1,075	0,073	2836	0,505	0,088
47	1,215	0,045	2145	0,437	0,095
52	1,258	0,033	1236	0,436	0,076
71	0,585	0,02	895	0,258	0,056
76	0,502	0,022	796	0,378	0,066
95	0,630	0,018	795	0,229	0,05
100	0,203	0,022	796	0,34	0,059

Příloha 12: Výsledky kultivace v přítomnosti CA pěny ve fermentoru

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 13, 15, 17)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(530nm)	c _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
0	0,029				
3	0,053	0,294	14595	0,54	3,927
5	0,084	0,287	13407	0,53	3,628
23	2,462	0,121	5246	0,534	0,103
29	2,398	0,116	4690	0,53	0,095
47	1,524	0,112	3232	0,584	0,075
53	1,476	0,074	2961	0,365	0,066
70	1,545	0,122	4937	0,998	0,179
76	1,315	0,1	4031	0,892	0,160
94	1,133	0,119	4470	0,946	0,158
100	1,003	0,107	3085	0,723	0,093

Příloha 13: Výsledky kultivace v přítomnosti AS pěny ve fermentoru

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 13, 15, 17)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(530nm)	c _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
0	0,019	0,258	12795	0,489	3,556
3	0,045	0,266	12370	0,465	3,170
6	1,278	0,27	11721	0,427	2,717
23	1,935	0,152	6558	0,213	1,355
30	1,818	0,166	6146	0,82	1,342
48	1,856	0,087	3980	0,426	0,087
54	1,825	0,097	4152	0,506	0,097
71	1,052	0,145	3573	0,68	0,074
78	1,125	0,067	2839	0,372	0,071
95	0,816	0,143	3523	0,546	0,060
100	1,065	0,072	3058	0,352	0,067

Příloha 14: Výsledky kultivace v přítomnosti CMC folie ve fermentoru

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 14, 16, 18)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
0	0,030				
3	0,029	0,112	18317	0,583	4,240
7	0,024	0,1	15297	0,606	4,132
25	2,123	0,209	9698	0,747	1,528
31	1,986	0,151	6049	0,747	1,324
47	1,381	0,111	3403	0,47	0,064
55	1,543	0,077	3277	0,336	0,064
73	1,025	0,085	2591	0,618	0,084
79	0,619	0,092	2809	0,617	0,084
95	0,754	0,077	2107	0,456	0,056
100	1,237	0,062	2621	0,407	0,078

Příloha 15: Výsledky kultivace v přítomnosti AS folie ve fermentoru

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 14, 16, 18)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(530nm)	C _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
0	0,034				
3	0,050	0,08	12172	0,721	4,916
6	0,051	0,095	14516	0,742	5,059
23	1,029	0,122	8743	0,488	1,553
30	1,728	0,171	6334	0,38	0,622
48	1,475	0,164	5059	0,655	0,089
55	1,532	0,111	4424	0,509	0,090
71	1,369	0,162	4997	0,787	0,107
78	1,344	0,143	4403	0,865	0,118
96	0,816	0,091	3334	0,316	0,052
100	1,065	0,08	3408	0,318	0,061

Příloha 16: Výsledky kultivace v glukosovém mediu ve fermentoru

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 14, 16, 18)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A _(600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A _(530nm)	c _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
2	0,000	0,203	33483	0,579	4,211
18	0,667	0,112	15264	0,563	3,412
20	0,856	0,091	11524	0,528	2,987
22	0,856	0,097	12302	0,487	2,755
24	0,867	0,099	11664	0,452	2,374
26	0,764	0,07	7859	0,390	1,970
43	0,489	0,087	8647	0,065	0,289
45	0,389	0,098	8880	0,061	0,246
47	0,833	0,083	7491	0,067	0,271
49	0,8	0,086	6992	0,178	0,194
67	0,5	0,08	7213	0,135	0,164
69	0,5	0,059	5269	0,141	0,171
71	0,611	0,079	7120	0,104	0,126
73	0,611	0,066	5917	0,195	0,236
91	0,672	0,077	7629	0,128	0,171
93	0,556	0,059	5269	0,163	0,198
95	1,111	0,053	4713	0,133	0,161
97	0,7	0,083	6742	0,154	0,168

Kultivace syrovátky na třepačce**Příloha 17: Gravimetrické stanovení biomasy – kultivace na třepačce**

Naměřené data stanovení biomasy při degradaci syrovátky (graf 23)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]				
	pH=5	pH=5,5	pH=6	pH=6,5	pH=7
24	0,1	0,04	0,12	0,04	0,02
48	0,44	0,24	0,42	0,1	0,08
70	0,36	0,52	0,4	0,98	1
96	0,5	0,54	0,54	1,04	1,62
166	0,94	0,94	1,28	0,96	1,72
190	0,48	0,7	0,8	0,62	1,48

Příloha 18: Stanovení CHSK kultivace na třepačce

Naměřené data CHSK u kultivace syrovátky (graf 24)

CHSK	čas[hod]	24	48	70	96	166	190
pH=5	A _(600nm)	0,112	0,108	0,119	0,133	0,019	0,022
	CHSK [mg.l ⁻¹]	61056	58833	64944	72722	28167	33167
pH=5,5	A _(600nm)	0,107	0,124	0,119	0,137	0,017	0,022
	CHSK [mg.l ⁻¹]	58278	67722	64944	74944	24833	33167
pH=6	A _(600nm)	0,105	0,125	0,119	0,132	0,008	0,021
	CHSK [mg.l ⁻¹]	57167	68278	64944	72167	9833	31500
pH=6,5	A _(600nm)	0,118	0,111	0,119	0,126	0,016	0,02
	CHSK [mg.l ⁻¹]	64389	60500	64944	68833	23167	29833
pH=7	A _(600nm)	0,109	0,105	0,118	0,118	0,034	0,029
	CHSK [mg.l ⁻¹]	59389	57167	64389	64389	53167	44833

Příloha 19: Vývoj pH během kultivace syrovátky na třepačce

Naměřené data pH při kultivaci na třepačce (graf 25)

čas[hod]	pH				
	pH=5	pH=5,5	pH=6	pH=6,5	pH=7
0	4,95	5,54	6,13	6,55	7
24	4,9	5,46	5,61	5,96	5,7
48	4,57	4,92	4,66	5,7	5,38
70	4,52	4,49	4,56	6,65	5,93
96	4,51	4,47	4,59	6,9	6,63
166	4,41	4,52	4,56	6,9	7,28
190	4,47	4,51	4,64	6,88	7,56

Kultivace syrovátky ve fermentoru

Příloha 20: Výsledky kultivace syrovátky ve fermentoru

Naměřené data stanovení biomasy, CHSK a redukujících cukrů kultivace ve fermentoru (graf 26, 27, 28)

čas[hod]	X _{biomasy} [g.l ⁻¹]	A (600nm)	CHSK [mg.l ⁻¹]	A (530nm)	c _{red.cukrů} [g.l ⁻¹]
0		0,054	51900	0,326	39,372
4	0,048	0,055	52900	0,164	19,807
19	1,624	0,055	49594	0,155	17,550
21	1,580	0,036	29663	0,179	18,916
23	1,360	0,046	38413	0,202	21,347
25	1,099	0,035	26731	0,189	18,546
27	1,044	0,04	28425	0,258	23,370
44	0,408	0,061	40494	0,226	18,765
46	0,647	0,053	34994	0,234	19,429
48	0,437	0,055	33063	0,286	21,588
50	0,403	0,085	51813	0,312	23,551
52	0,365	0,076	41569	0,299	20,313
66	0,369	0,056	40425	0,235	21,286
68	0,340	0,055	36369	0,260	21,588
70	0,391	0,052	31188	0,264	19,928
72	0,238	0,091	50006	0,273	18,546
74	0,170	0,064	34819	0,278	18,886
92	0,253	0,043	25563	0,230	17,361
94	0,263	0,06	36188	0,253	19,097

Poznámky:

* ředěno 1ml do 10ml a z tohoto roztoku 1ml do 10ml a dále 3ml do 10ml

* ředěno 1ml do 10ml a z tohoto roztoku 3ml do 10ml a dále 3ml do 10ml

* ředěno 1ml do 10ml a z tohoto roztoku 1ml do 10ml

* ředěno 1ml do 10ml a z tohoto roztoku 3ml do 10ml

* ředěno 0,5 ml do 10ml a z tohoto roztoku 1ml do 10ml

* ředěno 1ml do 10 ml